



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

**Optimización de los sistemas de criopreservación de
tejido ovárico para preservar la fertilidad en niñas
prepúberes con cáncer**

Autora

Alicia Marco Gabarre

Directores

Jesús Ciriza Astrain

Clara Malo Ladrero



Facultad de Medicina
Universidad de Zaragoza

Curso Académico 2022-2023

ÍNDICE

1. Resumen.....	2
2. Objetivos	3
3. Abreviaturas.....	3
4. Material y métodos	4
5. Situación actual	8
6. Marco teórico de la criopreservación	9
6.1 Contexto histórico	9
6.2 Obtención del tejido ovárico	10
6.2.1 Particularidades del tejido ovárico.....	10
6.2.2 Cantidad de tejido ovárico extraído	11
6.2.3 Técnica quirúrgica	12
6.3 Proceso de criopreservación.....	12
6.3.1 Bases de la criopreservación	12
6.3.2 Criopreservantes	13
6.3.3 Técnicas de criopreservación	14
6.4 Trasplante del tejido ovárico	17
6.4.1 Descongelación del tejido	17
6.4.2 Localización del trasplante	17
6.4.3 Pérdida folicular postrasplante	18
6.4.4 Riesgo de trasplante de células malignas.....	20
7. Resultados	21
7.1 Viabilidad	21
7.2 Morfología del tejido	22
8. Discusión	28
9. Conclusiones	31
10. Bibliografía	32

1. Resumen

Resumen

El cáncer durante la niñez y la adolescencia sigue siendo un importante problema de salud pública. Aunque los tratamientos contra el cáncer han mejorado las tasas de supervivencia, los efectos gonadotóxicos han sido poco estudiados, resultando en insuficiencia ovárica prematura en algunos casos. La preservación de la fertilidad es importante siendo la criopreservación del tejido ovárico la única alternativa a estas edades. La congelación de tejido ovárico también podría ser beneficiosa en mujeres adultas que sufren cáncer y se tienen que someter a un tratamiento inminente. El objetivo final de esta estrategia es implantar tejido ovárico una vez finalizado el tratamiento oncológico y la paciente se encuentre libre de enfermedad para potencialmente restaurar la función endocrina y permitir múltiples ciclos para la concepción. Sin embargo, el éxito del trasplante de tejido ovárico todavía tiene múltiples desafíos, como la baja cantidad de folículos en el injerto causada por los procesos de congelación y la posibilidad de reimplantar células malignas. La parte experimental de este trabajo de fin de grado tiene como objetivo mejorar el proceso de congelación de tejido ovárico para mejorar la calidad folicular en el tejido, incluyendo un pre-tratamiento con distintas enzimas para facilitar la penetración de los crioprotectores y conseguir una congelación más homogénea del mismo.

Abstract

Cancer during childhood and adolescence remains a major public health concern. Even though cancer treatments have improved survival rates, gonadotoxic effects have been poorly studied, causing premature ovary insufficiency in some cases. Fertility preservation is essential, being ovarian tissue cryopreservation the only choice for these age ranges. This technique could also be beneficial for adult woman suffering cancer who need immediate treatment. The final goal of the process is to implant ovarian tissue once the oncological treatment is finished and the patient cancer-free to restore endocrine function and allow ovarian cycles for conception. However, ovarian tissue transplantation faces yet multiple limitations, such as the important loss of follicles during the procedure and the risk of transplanting malignant cells. The experimental part of this final degree work aims to improve the ovarian tissue freezing process to improve the follicular quality, including a pre-treatment with different enzymes to facilitate the penetration of cryoprotectants and to achieve a more homogeneous freezing of the tissue.

Palabras clave: criopreservación, tejido ovárico, folículos, fertilidad, enzimas, cáncer, prepuberal

Key words: cryopreservation, ovarian tissue, follicles, fertility, enzymes, cancer, prepubertal

2. Objetivos

Datos previos (no publicados) del grupo de investigación *TME Lab* al cual pertenecen los directores de este trabajo de fin de grado, han demostrado que durante el proceso de congelación lenta utilizado en este trabajo y utilizado de forma rutinaria para preservar la fertilidad en muchos hospitales, los crioprotectores sólo penetran el 20% del grosor del tejido, quedando el 80% del interior del tejido sin el efecto protector de estas sustancias, no reduciendo el contenido de agua tisular, pudiendo ser una de las causas de la baja calidad folicular. La hipótesis de partida del presente trabajo es que se puede mejorar la calidad del tejido ovárico sometido a procesos de congelación-descongelación, facilitando la penetrabilidad de los crioprotectores mediante un tratamiento enzimático antes de congelar.

Así, el objetivo de este estudio es entender y mejorar el proceso de congelación de tejido ovárico utilizado actualmente para preservar la fertilidad en niñas con cáncer para poder aumentar sus probabilidades de embarazo en un futuro. Trabajaremos con la oveja como modelo animal. Este objetivo se desglosa en los siguientes subobjetivos:

- Realizar una búsqueda bibliográfica sobre el estado actual de las técnicas de criopreservación en tejido ovárico.
- Determinar experimentalmente el efecto de varios tratamientos enzimáticos antes de la congelación del tejido ovárico en la calidad del tejido a la descongelación.
- Seleccionar uno o varios tratamientos enzimáticos que permitan mejorar la supervivencia del tejido a la descongelación para seguir con la línea de trabajo de optimización del protocolo actual de congelación de tejido ovárico.

3. Abreviaturas

PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> / Tampón fosfato salino
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> / Medio Eagle Modificado de Dulbecco
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> / Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i> / Paquete estadístico para las ciencias sociales
FSH	Hormona foliculoestimulante
EG	Etilenglicol
PROH	Propanediol
AFPs	<i>Anti Frozen Proteins</i> / Proteínas anti-congelación
HPC	Hidroxipropilcelulosa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
UA	Unidades Arbitrarias
CAM	<i>Corioallantoic membrane</i> / Membrana corioalantoidea

Tabla 1. Abreviaturas usadas en el trabajo. Fuente: propia

4. Material y métodos

Diseño del estudio. Se realizó una revisión bibliográfica sobre lo que se conoce hasta la actualidad en criopreservación de tejido ovárico. Posteriormente, se investigó una estrategia de optimización de la criopreservación de dicho tejido, mediante un tratamiento antes de la congelación con 5 tratamientos enzimáticos diferentes (Tryple, Colagenasa, Dispasa, Acutasa, Hialuronidasa), comparando con un control sin tratamiento. Se utilizó el ovino como modelo animal por las similitudes con el ovario humano. Se realizó el estudio con ovarios de ovejas postpúberes (Figura 1).

La finalidad de la congelación del tejido ovárico es ofrecer un método de preservar la fertilidad a dos poblaciones: niñas prepuberales y mujeres adultas que tengan que someterse a un tratamiento inminente y no tengan tiempo de someterse a un tratamiento de fertilidad. El proyecto *HOMEOnChip* dentro del cual está englobado este trabajo, ya tiene aprobaciones éticas para utilizar tejido ovárico adulto humano, por ello se ha optado por iniciar los estudios en la población adulta. Los primeros estudios se están realizando en ovino adulto y serán extrapolados a humana adulta, seguidamente se harán en la población prepuberal ovina. Si se obtienen datos positivos serán presentados a CEICA para la aprobación ética para el uso de material humano prepuberal.

En el presente trabajo, se valoraron los siguientes parámetros: integridad de folículos y estroma (tinciones con hematoxilina-eosina), proliferación y apoptosis (técnicas de inmunohistoquímica) y viabilidad (calceína-ioduro de propidio). La parte experimental se llevó a cabo principalmente en la Unidad de Investigación Traslacional del Hospital Universitario Miguel Servet, excepto las valoraciones de viabilidad que se realizaron en el Instituto de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A; Universidad de Zaragoza) y las pruebas de inmunohistoquímicas que se realizaron en la Unidad de Anatomía Patológica del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA).

Estrategia de búsqueda. Se revisó la literatura en inglés y español sobre la criopreservación de tejido ovárico utilizando los métodos de búsqueda convencionales. Se utilizaron bases de datos como Pubmed, Scielo y Cochrane, con los criterios expuestos en la Tabla 2. Se complementó con publicaciones citadas en ciertos artículos y con material facilitado por profesores de la Universidad. Se dio preferencia a los meta-análisis y ensayos clínicos aleatorizados sobre al resto de la literatura disponible.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
Artículos relacionados con la criopreservación de tejido ovárico	Artículos relacionados con ovocitos y embriones
Publicados entre 2005 y la actualidad	Solo disponible el <i>abstract</i>
Escritos en español e inglés	
Con texto completo disponible	

Tabla 2. Criterios de inclusión y exclusión de búsqueda bibliográfica. Fuente: propia.

Términos:

- **Términos MeSH:** *cryopreservation, ovary, tissue, ovocyte, embryo*
- **Términos DeCS:** *ovario, tejido, criopreservación, ovocito, embrión*

Cadena de búsqueda. Para determinar las cadenas de búsqueda se utilizaron los siguientes operadores: AND, NOT.

- Cryopreservation AND ovary AND tissue
- Cryopreservation AND ovary NOT ovocyte NOT embryo

Base de datos	Cadena de búsqueda	Resultados	Escogidos
Pubmed	Cryopreservation AND ovary AND tissue	1466	32
	Cryopreservation AND ovary NOT ovocyte NOT embryo	1039	
Scielo	Cryopreservation AND ovary AND tissue	6	1
Cochrane	Cryopreservation AND ovary AND tissue	53	10

Tabla 3. Estrategia de búsqueda bibliográfica. Fuente: propia.

Tratamiento enzimático pre-congelación de las muestras. Se analizó el efecto de 5 tratamientos enzimáticos pre-congelación y se incluyó un control sin enzimas. Se realizaron 4 réplicas por tratamiento y tiempo de valoración. Todas las muestras fueron congeladas siguiendo el mismo protocolo de congelación lenta. Para ello, se obtuvieron los ovarios ovinos de ovejas adultas del matadero, transportados en medio PBS (*Phosphate Buffer Solution*) con antibióticos. Una vez en el laboratorio, se eliminó la parte medular de los ovarios para limitarlos a la zona de corteza, que es la que interesaba para el estudio porque es donde se encuentran los folículos. Se realizaron muestras de 1 mm de grosor aproximadamente, cortadas en cuadriláteros de 1cm x1 cm. Los tratamientos enzimáticos utilizados fueron: 1) Tryple (9 ml de PBS y 1 ml de la solución comercial del cóctel enzimático *TrypLE*® al 10 x); 2) Colagenasa (0,83 mg/ml); 3) Dispasa (2,5 mg/ml); 4) Acutasa (*Acumax*®); 5) Hialuronidasa (2,5 mg/ml). Todos los tratamientos enzimáticos se incubaron durante 10 minutos a 37°C. Se realizaron 3 lavados de las muestras con PBS antes de iniciar el proceso de congelación. Se consideró como control la muestra no tratada con enzimas antes de congelar.

Congelación. Para el proceso de congelación se utilizaron 3 soluciones: Solución 1: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) + 5% FBS (suero fetal bovino); Solución 2: Solución 1 + 10% DMSO (dimetil sulfóxido) y Solución 3: Solución 2 + 12% DMSO. Se prepararon 40 ml de solución 1 en total. Las muestras para cada tratamiento se depositaron en tubos con 8 ml con la solución 1. Se añadieron 8 ml de solución 2 (concentración final de DMSO 5%) y se incubación durante 20 minutos. Tras la incubación, se retiraron 8 ml y se añadió el mismo volumen de la solución 3 (concentración final de DMSO de 8,5%). Se incubaron durante 15 minutos. Tras la segunda incubación, se recogió 1 ml de la solución de las muestras a un criotubo de 2 ml y con unas pinzas se traspasaron las muestras a dichos crioviales. Este proceso fue llevado a temperatura ambiente hasta el traspaso de las muestras a un *cell freezer* donde se disminuyó la temperatura a la velocidad de 1°C/minuto hasta alcanzar los -80°C (aproximadamente 24 horas). Finalmente, las muestras fueron almacenadas en un tanque de nitrógeno líquido a una temperatura de -196°C.

Descongelación del tejido. Se sumergieron los crioviales en un baño maría a 42° donde se agitaron hasta la completa descongelación de las muestras. Luego se realizaron 3 lavados con PBS para retirar los crioprotectores.

Valoración y cultivo. Las muestras fueron evaluadas antes de congelar, a las 0h de descongelación y a los 2 y 7 días de cultivo. Como medio de cultivo se utilizó medio DMEM suplementado con L-glutamina (1%) y suero fetal bovino (20%). Se cubrieron las muestras con 2 ml del cultivo y se llevaron a la incubadora para cumplir los tiempos establecidos de observación. Las condiciones de cultivo fueron a 37° y 5% de CO₂. Se valoraron 3 parámetros: viabilidad, proliferación celular y morfología del tejido.

Viabilidad. Para estudiar la viabilidad del tejido se utilizó una tinción combinando calceína y yoduro de propidio. Se realizó una mezcla de ambas tinciones con un volumen de 3 ml de PBS, 12 microlitros de solución stock calceína y 18 microlitros de solución stock de yoduro de propidio. Concentración de ambas soluciones stock final: 1mg/ml. De esta mezcla final se añadieron 250 microlitros a cada muestra. Se incubaron las muestras durante 30 minutos. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS, para eliminar los excesos de fluorocromos. A continuación se procedió a la clarificación de las muestras para eliminar los excesos de pigmentos y tener mejor visibilidad de la viabilidad del tejido (primera vez que se usa la técnica de clarificación para valorar viabilidad en tejido ovárico). Para ello, se añadió a las muestras 400 microlitros de solución clarificante al 50% (solución clarificante stock: PBS 1:1). Se incubaron las muestras durante 2 horas y tras este tiempo se retiró la solución al 50%, añadiendo el mismo volumen de solución clarificante stock al 100% e incubando durante 45 minutos. Tras esta incubación, se visualizaron las muestras bajo un microscopio confocal (*Nikon TI-E-c1 Confocal modular*), con una longitud de onda de 590/50nm para calceína (marcando células vivas) y de 650LP nm para yoduro de propidio (marcando células muertas). Para todas las mediciones se estableció una ganancia fija de 95 para el verde y de 97 para el rojo. Las fotografías de los distintos tratamientos y tiempos fueron procesadas con el mismo programa informático *ImageJ/Fiji*, cuantificando el verde y el rojo en unidades arbitrarias (UA). Estos datos se usaron para calcular el % de viabilidad del tejido (UA verde/Suma de UA verde y rojo; %).

Inmunohistoquímica. Se valoró la proliferación celular mediante un kit de PCNA y la apoptosis mediante un kit de caspasas (Apoptag). Para ello, las muestras se fijaron en formaldehído al 4% para la inclusión en bloques de parafina. Se realizaron cortes de estos bloques para valorar la inmunohistoquímica (PCNA y Apoptag) y también un corte seguido de tinción con hematoxilina-eosina para la morfología del tejido. Los resultados de estas técnicas no se han podido incluir en este trabajo por no estar disponibles para la fecha de entrega, al existir problemas en la puesta a punto de estos kits.

Morfología del tejido. Se valoraron las preparaciones de hematoxilina-eosina bajo microscopio óptico de campo claro para el estudio morfológico de los folículos y el estroma ovárico. Folículos íntegros se consideraron aquellos que mantenían la integridad de membranas y zonas (zona teca, lámina basal, zona granulosa, zona pelúcida, membrana plasmática, membrana nuclear), presencia de picnosis y necrosis. Estroma íntegro se consideró cuando el tejido conectivo e intersticial no presentaba espacios blancos, mantenía una buena celularización y no aparecían focos de necrosis o apoptosis.

Análisis estadístico de la viabilidad. Los datos de viabilidad se analizaron utilizando el SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) version 19.0 (SPSS, Chicago, IL). Se analizó la normalidad de la distribución con el test de Kolmogorov-Smirnov, obteniendo una distribución no normal en los datos. Diferencias significativas se consideraron con un valor $p < 0,05$. Se compararon las diferencias entre tratamientos con el test de Kruskal-Wallis, aplicando un posthoc.

Limitaciones del estudio. Por problemas en la optimización de los protocolos de inmunohistoquímica en el CIBA no se han podido incluir estos datos en el trabajo, quedan pendientes para poder ser incluido en la futura publicación que se espera de este trabajo. Algunas muestras se contaminaron durante el proceso de cultivo (2 muestras de las 48 totales que se cultivaron). Para las muestras analizadas para viabilidad antes de la congelación sólo se contaron con 2 réplicas porque las otras 2 réplicas se perdieron por problemas en la clarificación.

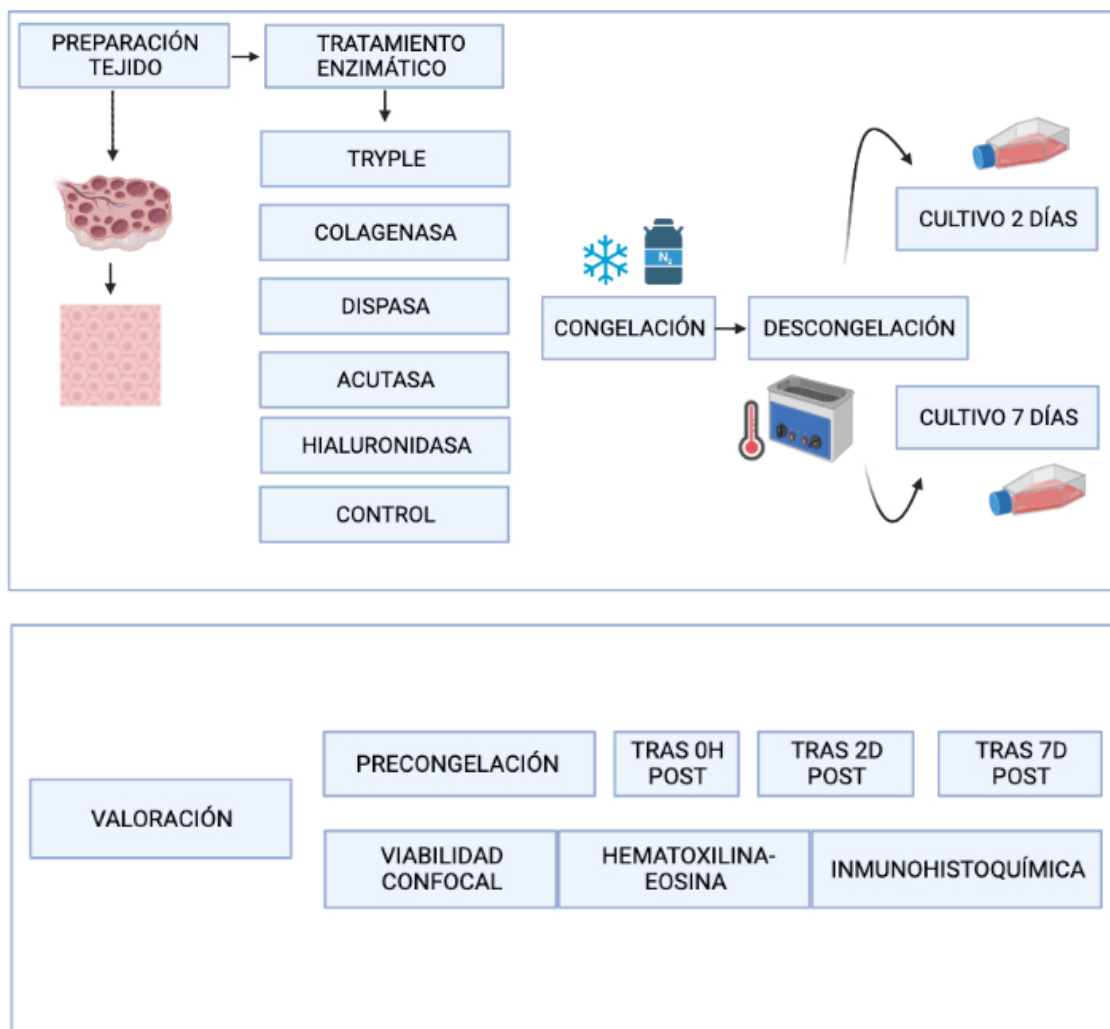


Figura 1. Diseño de la parte experimental del estudio. Fuente: propia.

5. Situación actual

Se calcula que en el mundo cada año padecen cáncer unos 400000 niños y adolescentes (1). En España se han registrado 11784 casos de cáncer infantil en los últimos 10 años de los cuales 5308 han afectado a niñas (2). Los tumores que más afectan a esta franja de edad son, en primer lugar, los tumores hematológicos, encabezados por las leucemias, seguido de los tumores del sistema nervioso central, especialmente el neuroblastoma. Cobran bastante importancia también los tumores óseos, como puede ser el Sarcoma de Ewing. Pese a que se podría pensar que estos tumores no afectan en un primer lugar al tejido ovárico de las pacientes, algunos de los tratamientos que se administran para erradicarlos son muy gonadotóxicos (3)(4), haciendo que la fertilidad de estas pacientes pueda verse comprometida. Estos tratamientos fundamentalmente son la radiación pélvica y los agentes alquilantes quimioterápicos como la Ciclofosfamida o el Busulfán (5). Por este motivo, se ha investigado exhaustivamente sobre cuál es la mejor forma de conservar la fertilidad de estas niñas, ateniendo a su edad, características y necesidades, ya que en muchos casos no solo es el futuro reproductivo lo que les concierne, sino la ausencia de desarrollo puberal fisiológico.

Actualmente, las principales técnicas para conservar la fertilidad de una mujer adulta son la congelación de embriones y la congelación de óvulos. Estas requieren de un tratamiento de estimulación ovárica que implica una maduración hormonal previa y por tanto de un eje hipofisario-hipotalámico-ovárico desarrollado. Sin embargo, en el caso de las niñas prepúberes, su falta de maduración hormonal y la imposibilidad de retrasar el tratamiento oncológico, hace que su única opción sea la congelación de tejido ovárico y futuro trasplante, donde no es necesario ninguna preparación hormonal previa y se puede realizar en cualquier momento. De igual manera, aquellas mujeres adultas que requieran de quimioterapia inminente podrían beneficiarse de esta técnica (Figura 2).

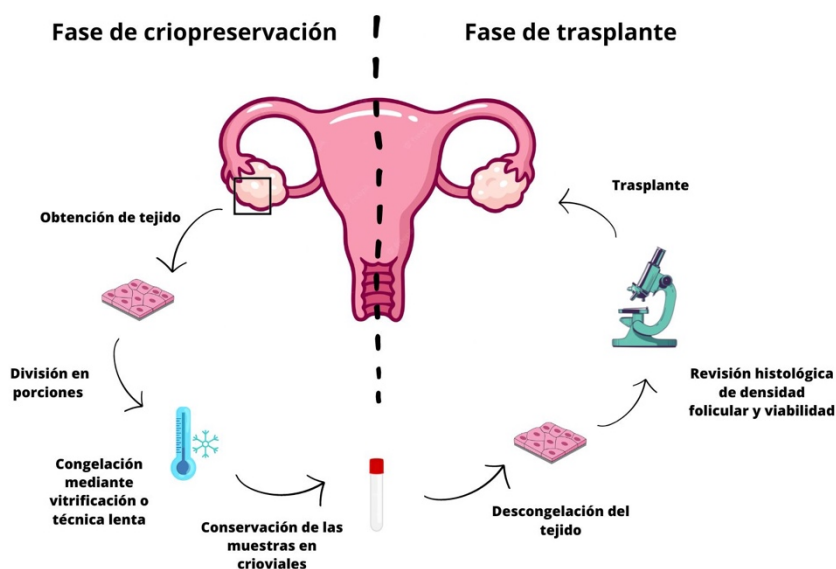


Figura 2. Esquema sobre el proceso de la congelación de tejido ovárico. Fuente: propia

La congelación de tejido ovárico y el posterior trasplante ha dado resultados esperanzadores. Desde que empezó a utilizarse la criopreservación de tejido ovárico, se han evidenciado unos 200 nacimientos de niños mediante esta técnica de conservación de fertilidad, un porcentaje significativo (15-20%) realizado en niñas prepúberes (6). Pero, pese a estos resultados esperanzadores, existen todavía dos limitaciones importantes de la técnica. En primer lugar, el hecho de que en mujeres adultas se ha observado que se produce una pérdida de más del 50% de los folículos por daños isquémicos y oxidativos al trasplantar el tejido y, por otro lado, el riesgo de reintroducir tejido oncológico que pudiera existir en la muestra congelada (7). Se precisa de una mejora en el proceso de congelación de tejido ovárico, así como buscar otras alternativas al trasplante, como podría ser el desarrollo de sistemas in vitro para madurar los folículos primordiales hasta óvulos inmaduros prescindiendo así del trasplante de tejido y los riesgos que este conlleva.

6. Marco teórico de la criopreservación

6.1 Contexto histórico

Durante los siglos XVIII y XIX un cirujano americano llamado Robert Morris dio los primeros pasos en el trasplante de tejido ovárico, incluso cuando la mayoría de las hormonas no se conocían. Demostró que la atrofia uterina era reversible y que los síntomas menopáusicos se podían abolir realizando estos trasplantes (8). En cuanto al autotrasplante tras criopreservación, los primeros estudios fueron desarrollados en ovejas en el año 1994. Al reintroducirlas los fragmentos de tejido que se les había previamente extraído y congelado, se consiguió restaurar la función ovárica y tener concepción natural (9). A partir de este hallazgo, comenzaron a realizarse estudios en diferentes animales, demostrando que efectivamente era posible restaurar la función endocrina y fértil. Se llevaron a cabo estudios in vitro valorando si esto pudiera extrapolarse a humanos, con el primer autotrasplante de tejido ovárico humano en 1999 a manos del Doctor Oktay. Este procedimiento fue un éxito y su equipo de investigación comenzó a estudiar cómo mejorar la técnica (10). En 2004 se consiguió el primer nacimiento vivo en una mujer que había acudido a esta técnica de conservación de fertilidad por verse afectada por un linfoma de Hodking (11).

Sin embargo, no fue hasta 2013, cuando se registró uno de los primeros casos donde se consiguió inducir la pubertad a una niña que había recibido quimio y radioterapia produciéndole fallo ovárico primario. Sufría de Sarcoma de Ewing y a los 9 años se le congeló parte de su ovario izquierdo. Cuatro años después, tras la remisión completa de su enfermedad, sufría fallo ovárico primario severo con niveles de hormona foliculoestimulante (FSH) postmenopáusicos. Tras trasplantarle 2 muestras del tejido en el ovario restante, que había sufrido las consecuencias del tratamiento y presentaba vascularización precaria, se logró durante los 4 meses siguientes obtener un estadio 4 de Tanner y menstruaciones regulares, consiguiendo función ovárica durante 19 meses con solo 2 fragmentos (12). Este estudio fue muy innovador y esperanzador debido a las características del paciente y abrió nuevos objetivos en el campo de investigación. Desde entonces se ha buscado cómo optimizar esta técnica e incrementar sus tasas de éxito.

6.2 Obtención del tejido ovárico

6.2.1 Particularidades del tejido ovárico

Estructura y reserva ovárica

El ovario se divide anatómicamente en médula y corteza. La médula está formada por tejido conectivo laxo donde se encuentra mayoritariamente el componente vascular del órgano. Mientras que en la corteza encontramos el estroma con los folículos ováricos. Un folículo ovárico es una estructura formada por una célula germinal femenina rodeada de una capa de células foliculares. Es importante mencionar que el 90% de los folículos que se encuentran en la corteza se encuentran en estadio de folículos primordiales. Existen otro tipo de folículos (primarios, secundarios, maduros) que comienzan a verse una vez la niña alcanza la pubertad e inician los ciclos menstruales y que son el resultado de la maduración de los folículos primordiales. El folículo primordial, sin embargo, es el estadio madurativo que interesa para la criopreservación ya que su menor tamaño, bajo contenido de agua y bajo requerimiento metabólico les hace más resistentes al estrés y por tanto les asegura una mayor supervivencia. Además, los folículos primordiales son la principal población celular del ovario prepuberal, lo que hace que esta técnica sea todavía más beneficiosa todavía para las niñas ya que parten de una reserva mucho mayor (Figura 3)(13).

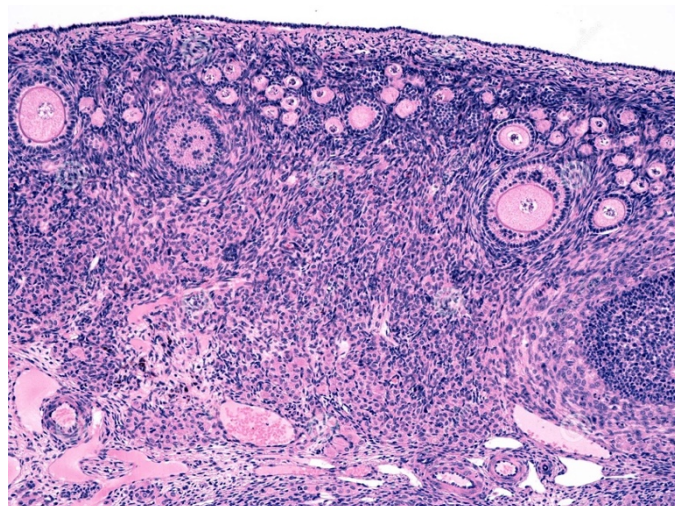


Figura 3. Pieza histológica de corteza ovárica, donde se ven diferentes tipos de folículos, estando los primordiales en la parte más superior (13)

En un estudio realizado por M. Christianson et al., se describieron las consecuencias de tener mayor reserva de folículos primordiales examinando la densidad folicular de seis pacientes menores de 18 años (prepúberes y púberes) que iban a someterse a trasplante de tejido ovárico. Estas pacientes sufrían fundamentalmente de Linfoma de Hodgkin y se les extirpó una biopsia de tejido ovárico al mismo tiempo que se les colocaba el catéter de la quimioterapia. Sus tejidos se conservaron congelados durante varios días y después se trasplantaron a ratones. Tras unos días en el animal, se extrajeron muestras para evaluar el estado del tejido. Se observó que la densidad folicular era mayor en mujeres prepuberales que en púberes, demostrando una relación entre edad, densidad y estado madurativo folicular. Se demostró así que la duración de la función ovárica tras el trasplante está directamente relacionada con el tipo folicular y su densidad. Al haber mayor densidad de folículos primordiales en prepúberes, se espera que la duración del trasplante fuera superior. Otra de las conclusiones que sacaron de este estudio fue que,

si conocemos la reserva ovárica de la paciente previamente a la recogida del tejido, podemos estimar el éxito y duración de dicho trasplante. Si la mujer parte de pobre reserva de folículos primordiales, será más difícil conseguir una larga funcionalidad del injerto. Este estudio, sin embargo, debe leerse con precaución, pues es una muestra de pacientes pequeña y el tiempo de congelación del tejido es muy breve en comparación con los tiempos habituales usados en esta técnica (14).

Función hormonal del tejido ovárico

La congelación de tejido ovárico tiene una gran ventaja en comparación a las otras técnicas de conservación de fertilidad, y es que permite restaurar también la función hormonal. Esto es crucial, ya que a menudo las niñas y sus familias no se preocupan por el futuro reproductivo sino por la mera maduración sexual que es propia de dicha edad. Debemos tener en cuenta que el tejido ovárico no solo produce los gametos sino también las hormonas sexuales que además de iniciar el desarrollo puberal se encargan de funciones metabólicas importantes como el mantenimiento cardiovascular y óseo. Esto es trascendental, ya que esta restauración endocrina evita el riesgo de que las niñas se encuentren en una situación postmenopáusica a edades tempranas (15). Muchas veces se intenta conservar uno de los ovarios para intentar mantener dicha función, pero si el tratamiento daña el órgano, el trasplante de tejido es la única opción para solucionar este problema. En un estudio longitudinal de 10 años de duración realizado en 5 niñas observaron que todas restauraron su función endocrina en torno a la semana 11 tras el trasplante, con duraciones del injerto de hasta 7 años, pese a que alguna requirió de segundos trasplantes para ello (16).

6.2.2 Cantidad de tejido ovárico extraído

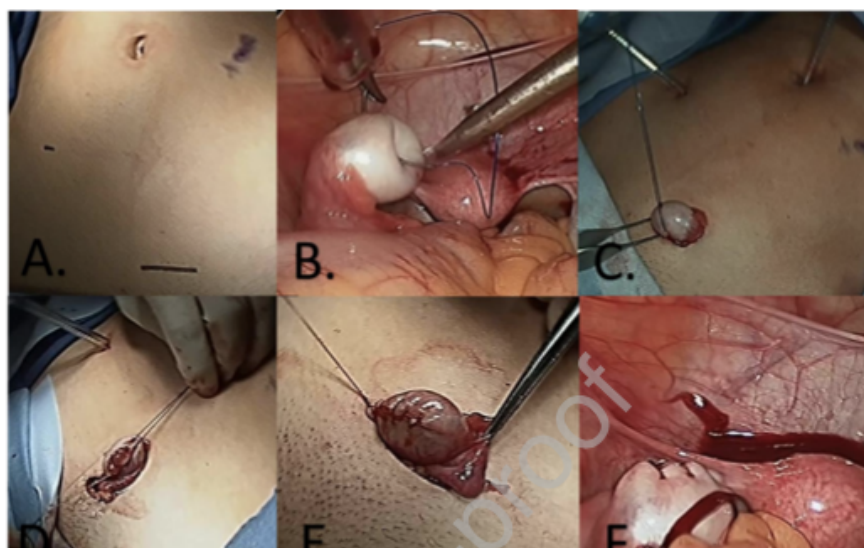
Hasta hace relativamente poco, se extraía el ovario en su totalidad y se fragmentaba en finas láminas para su almacenamiento. Sin embargo, se vio que había muchos casos donde el riesgo de fallo ovárico primario era escaso, y por tanto no había un riesgo/beneficio que justificara extraer toda la gónada. Así, en las estrategias actuales, se extrae más o menos tejido en función de la probabilidad de fallo ovárico que presente la paciente, extirpando todo el ovario cuando la mujer presenta un riesgo mayor del 80% (17).

Para el cálculo del riesgo es importante valorar la edad, el tipo de cáncer, el tipo de tratamiento que se va a realizar y su duración. En esta línea, R. Clark et al. estudiaron la posibilidad de fallo ovárico precoz en supervivientes con cáncer infantiles. Definieron dicho fallo ovárico como la pérdida de función ovárica dentro de los 5 años del diagnóstico de la enfermedad o bien como la ausencia de menarquia a los 18 años tras el tratamiento. Algunos de los parámetros que valoraron para el cálculo fueron: radiación, dosis, localización, edad, menarquia o no, tipo de cáncer, exposición a quimioterápicos (especial atención a los alquilantes) y si habían recibido o no trasplante de progenitores hematopoyéticos. Vieron que la mejor forma para calcular el riesgo era determinar el daño en el ovario según la dosis y cantidad de quimio y radioterapia recibida (15). Por poner un ejemplo, radiaciones de 20-30 Grays en zona pélvica podrían provocar fallo ovárico primario (18). De cualquier forma, en pacientes prepúberes, se ha visto que el riesgo de fallo ovárico primario es menor que en adultas, por lo se tiende a seguir medidas más conservadoras (19).

Se estudió también la posibilidad de extraer y conservar el ovario en su totalidad, pero los resultados de congelación son mucho peores y hay un riesgo aumentado de trasplantar células malignas (20).

6.2.3 Técnica quirúrgica

Para la obtención de tejido, la opción menos lesiva consiste en realizar una laparoscopia donde el ovario se maneja con suturas de tracción monofilamentosas para colocarlo de forma extracorpórea y poder extraer el tejido necesario sin tener que retirarlo al completo, pudiendo volver a colocar con facilidad el tejido ovárico restante en su sitio funcional (17). Las tasas de complicaciones son inexistentes y se consigue una muestra de tejido óptima. Es una técnica segura y que beneficia a las pacientes oncológicas que quieren conservar su tejido ovárico de una forma rápida sin retrasar el comienzo de su tratamiento quimioterápico (21) (Figura 4).



6.3 Proceso de criopreservación

6.3.1 Bases de la criopreservación

El almacenamiento de células y tejidos a bajas temperaturas para su conservación es una técnica que lleva investigándose desde el siglo XIX. Este procedimiento tiene una serie de limitaciones importantes dado que las células de nuestro cuerpo no están programadas para soportar temperaturas tan bajas. Considerando que el 80% de la masa del tejido es agua, someterlo a la congelación puede traducirse en una serie de consecuencias bioquímicas y estructurales muy dañinas para las células que lo componen. Principalmente encontramos dos: la formación de cristales de hielo que disrumpen los componentes de la membrana celular y alteran su estructura y los incrementos en la concentración de solutos en la fase líquida remanente, llevando a un estrés osmótico muy tóxico (22). Para evitarlos, es fundamental el uso de criopreservantes y un conocimiento específico sobre cada tipo de célula y sus características, ya que el tamaño y la composición celular harán que su comportamiento ante la disminución de la temperatura sea diferente.

6.3.2 Criopreservantes

Los criopreservantes o agentes crioprotectores son sustancias hidrosolubles con baja toxicidad que disminuyen el estrés osmótico que sufren las células al someterse al proceso de congelación. Podemos dividirlos según su naturaleza o según su penetrancia. Según su naturaleza diferenciamos:

- Alcoholes: etanol, etilenglicol (EG), propanediol (PROH), glicerol
- Azúcares: glucosa, lactosa, sucrosa, sacarosa
- Azufres orgánicos: dimetil sulfóxido (DMSO)

Según la penetrancia de los crioprotectores diferenciamos dos grupos que se describirán a continuación: penetrantes y no penetrantes.

Criopreservantes penetrantes

Presentan un bajo peso molecular lo que les da una elevada permeabilidad a la membrana celular. Su presencia genera una diferencia de concentración a través de la membrana que se traduce en una salida de agua por parte de las células. Así mismo, los criopreservantes penetran en la célula, manteniendo su volumen. Los más utilizados son glicerol, DMSO y EG. La composición molecular del glicerol permite la formación de puentes de hidrógeno con las moléculas de agua durante el enfriamiento bloqueando la formación de hielo. Además, también tiene efectos sobre la membrana plasmática, ya que al unirse a sus fosfolípidos los estabiliza frente al estrés que sufren estos en condiciones de deshidratación (23). Pese a todas estas características beneficiosas, se debe de considerar también los efectos tóxicos que presenta, como puede ser la desnaturalización de proteínas. El DMSO es un compuesto solvente bipolar, aprótico e hidrosoluble. Disminuye el grosor de membrana y por tanto aumenta su permeabilidad. Comparte mecanismos similares moleculares con el glicerol. Además de sus funciones criopreservadoras, se ha visto que tiene de igual forma características antiinflamatorias y bacteriostáticas. Por último, el etilenglicol es una sustancia viscosa con gran capacidad para absorber agua. Esto se debe a la presencia de dos grupos hidroxilo en su estructura, que hace que sea miscible con el agua en todas las proporciones.

Criopreservantes no penetrantes

Estas sustancias presentan un alto peso molecular y son efectivos a altas concentraciones, ya que producen una rápida deshidratación celular. Son polímeros que forman puentes de hidrógeno con el agua. A su vez se unen a los fosfolípidos de la membrana, favoreciendo que mantengan su estabilidad y por tanto su integridad. Por estas características suelen asociarse a los criopreservantes penetrantes. Entre los más destacados se encuentran sacarosa, glucosa, dextrosa y dextrano.

Además de los criopreservantes propiamente dichos, se han estudiado otras sustancias que se pueden añadir al medio de congelación para mejorar resultados. Entre ellas se encuentra la albumina, que además de su potencial de regulación oncótica, puede colaborar con el control del pH del medio. Los antioxidantes se ha demostrado que reducen los daños isquémicos post-trasplante, pero ello se comentará en el apartado de trasplante. Por tanto, no solo debemos conocer bien los tipos de criopreservantes y sus propiedades, sino también otras sustancias que puedan optimizar el proceso, lo cual es el objetivo de este trabajo, estudiando ciertas enzimas y su efecto en el aumento de la

penetrabilidad del criopreservante en el tejido ovárico. Ha sido referencia para este objetivo un estudio que valora el uso de colagenasa previo a la congelación en tejido de ratón para aumentar la penetración de crioprotectores, como se mencionará en el apartado de discusión (24).

5.3.2 Técnicas de criopreservación

Existen principalmente dos formas de congelación, la denominada congelación lenta y la rápida o vitrificación.

Congelación lenta

En la congelación lenta, los tejidos se exponen a dosis bajas de criopreservantes y se almacenan en un congelador programable o en cajas de congelación (*cell-freezer*) que va descendiendo la temperatura paulatinamente (25). La congelación lenta busca una salida paulatina de agua del interior de las células que minimice la formación de cristales intracelulares. Sin embargo, esto tiene un límite, pues si se hace de forma muy lenta puede llevar a una deshidratación excesiva de las células y por tanto un daño letal. Por ello, es esencial encontrar la velocidad de congelación óptima, que permita un buen proceso celular de criopreservación celular y que asegure una buena viabilidad post-congelación. La velocidad de congelación es específica para cada célula, ya que no todas tienen las mismas características y por tanto la curva de congelación que funciona bien para unas puede ser tóxica para otras y viceversa (26) (Figura 5).

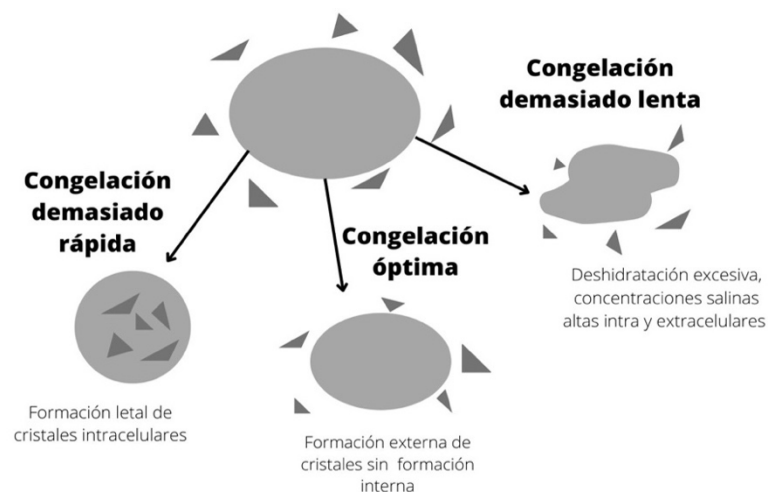


Figura 5. Esquema de los problemas de las velocidades de congelación. Fuente: propia

En el tejido ovárico, donde hay una combinación de diferentes tipos celulares, se ha visto que, para efectuar la congelación lenta, lo mejor es realizarlo programando el congelador en diferentes rampas de congelación que disminuyen la temperatura paulatinamente. Un ejemplo de este proceso sería (27):

- 1ª rampa: enfriamiento de 16°C a -7°C a un ritmo de 2°C/min
- 2ª rampa: mantenimiento de -7°C durante 10 minutos
- 3ª rampa: enfriamiento de -7°C a -30°C a un ritmo de 0.3°C/min
- 4ª rampa: enfriamiento de -30°C a a -150°C a un ritmo de 50°C/min
- 5ª rampa: mantener a -150° aproximadamente 30 minutos y transferirlos después al espacio de almacenamiento con nitrógeno líquido.

En el hospital de la Fe de Valencia, pionero en España en ofrecer la criopreservación de tejido ovárico como método de conservación de la fertilidad, se utiliza el siguiente procedimiento de congelación lenta (28): se emplea un medio compuesto de albumina sérica al 5%, DMSO al 10% y Medium 199. Tras sumergir las muestras 15 minutos en DMSO al 5% y 15 minutos al 10% se introducen en un congelador programado con el siguiente protocolo:

- 1º rampa: enfriamiento de 10 a -8°C a 1°C/min
- 2º rampa: enfriamiento hasta -15°C a 2,5°C/min
- 3º rampa: mantenimiento durante 9 minutos a -15°C
- 4º rampa: enfriamiento hasta -35°C a 0,5°C/min
- 5º rampa: enfriamiento hasta -60°C a 5°C/min
- 6º rampa: enfriamiento hasta -120°C a 10°C/min
- Traslado de las muestras a nitrógeno líquido a -196°C.

Este método es el que es usado a nivel nacional. En nuestra provincia, en el hospital Miguel Servet, se realizó por primera vez en Junio de 2022.

En la bibliografía podemos encontrar varios artículos donde usan distintos protocolos de congelación lenta para el tejido ovárico con resultados similares. Sin embargo, no hay estudios comparativos suficientes que hayan analizado los diferentes factores fundamentales en el protocolo de congelación que hemos mencionado(27).

Congelación rápida o vitrificación

En la vitrificación se exponen las muestras de tejido a criopreservantes a altas concentraciones y se someten a altas temperaturas de congelación. El cambio de temperatura ambiente a -196º se produce de forma ultrarrápida. Esto hace que no se requiera de un equilibrio osmótico entre los espacios intra y extracelular: la solución se solidifica por enfriamiento rápido hasta formar un estado vídrioso por un aumento de su viscosidad. Este cambio tan rápido de temperatura evita el “*chilling injury*” la ventana de mayor daño por frío que ocurre entre los 15 y los -5°C.

Uno de los principales problemas que acarrea esta técnica es que las dosis altas de criopreservantes pueden llegar a ser tóxicas y por tanto contraproducentes. Para ello, se combinan diferentes criopreservantes con diferentes características con el fin de reducir dicha toxicidad. Así mismo, se ha valorado la utilización conjunta de los criopreservantes con AFPs (*Anti Frozen Proteins*), que permitirían disminuir la dosis de los primeros con el mismo bajo riesgo de lesión por congelación (29). Existen kits de vitrificación comercializados para congelación de óvulos, embriones y también para tejido ovárico aunque sea una técnica menos utilizada. En general estos kits están formados por varias soluciones con concentraciones crecientes de crioprotectores que permiten una congelación secuencial de las muestras. Así por ejemplo, la marca *Kitazato* (30) se caracteriza por el uso de unas soluciones que contienen los siguientes componentes:

- Hidroxipropilcelulosa (HPC) previene el riesgo de contaminación, aumenta la tasa de supervivencia en los blastocistos eclosionados y reduce el estrés mecánico durante la desvitrificación.
- Trehalosa funciona como un agente osmótico en lugar de la sacarosa. Tiene cierto poder crioprotector, mejorando la protección de las membranas celulares.
- DMSO en combinación con etilen-glicol, criopreservantes en el medio y que aseguran menor toxicidad y mejores resultados tras la desvitrificación.
- Gentamicina, que prolonga la esterilidad del medio garantizando una mayor seguridad en el uso de las soluciones.

En la Figura 6 podemos ver el método de criopreservación de tejido ovárico sugerido por el kit Kitazato, y sus variaciones según si se hace en un medio cerrado o abierto. Este kit no está disponible comercialmente en la Unión Europea todavía.

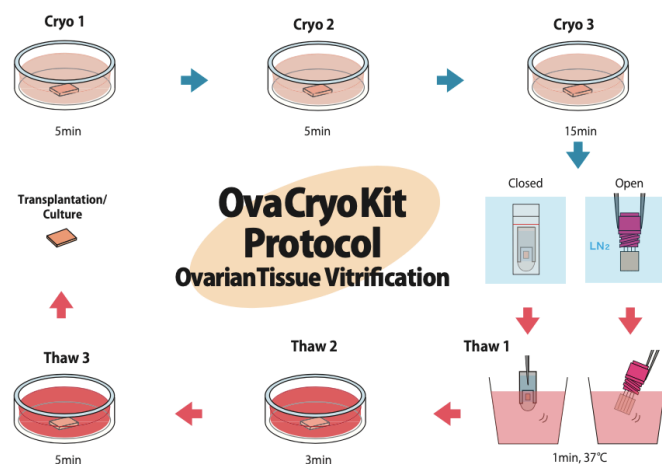


Figura 6. Esquema de funcionamiento del kit Kitazato para la criopreservación de tejido ovárico (29)

Comparación entre congelación lenta y vitrificación

El método de vitrificación ha adquirido protagonismo a lo largo de los últimos años ya que se ha visto que evita el problema de la formación de cristales de hielo, sin obtener peores resultados a nivel de viabilidad y reserva. En congelación de ovocitos y embriones es el método por excelencia y usado de forma rutinaria en las clínicas de fertilidad. Sin embargo, el tejido ovárico está compuesto por muchos tipos de células, que hacen que el protocolo de vitrificación sea complejo y todavía quede mucho por investigar sobre cuál es la forma óptima de realizarlo.

En esta línea, se han publicado dos revisiones que comparan las diferencias entre congelación lenta y vitrificación en tejido ovárico analizando todos los estudios realizados en los últimos años. En el metaanálisis realizado en 2017 por Qingquan et al. se vio que no solo no había diferencias estadísticamente significativas a nivel de densidad folicular y porcentaje de folículos primordiales entre las dos técnicas, sino que además en la vitrificación había una mejor conservación de células estromales y un menor daño del ADN (31). Por otra parte, en la revisión llevada a cabo por Kometas et al. se observó que tampoco existían diferencias morfológicas, aunque se vio que existe

un gran factor limitante, y es que muchas mujeres en las que se realiza la congelación de tejido ovárico acaban no recurriendo a su descongelación y trasplante, lo que impide ver resultados de la técnica (32). En nuestro país, un estudio realizado en el hospital de la Fe de Valencia observó que al trasplantar tejido ovárico humano en ratones inmunodeprimidos había un menor número de folículos primordiales y una menor reserva folicular en la técnica de congelación lenta en comparación con la vitrificación (28).

Aunque la congelación lenta es el método más estandarizado en España y Europa para el tejido ovárico, los resultados obtenidos en estos estudios, y el hecho de que la vitrificación es un proceso más económico en recursos y tiempo, podrían hacer que en un futuro se incluyera la vitrificación como técnica alternativa para la conservación de tejido ovárico (9). Se necesita más investigación en esta línea de cara a conocer cuál es la forma más segura y con los mejores resultados.

6.4 Trasplante del tejido ovárico

6.4.1 Descongelación del tejido

El proceso de descongelación del tejido y su trasplante es un punto crítico donde se puede perder la viabilidad del tejido. En función del tipo de congelación y los criopreservante utilizados el proceso de descongelación varía. En cuanto a la vitrificación, uno de los métodos para descongelar el tejido es dejándolo 2 minutos a temperatura ambiente en una solución de descongelación y de ahí sumergirlo en un baño maría a 37°C (20)(22)(33). En cuanto a la congelación lenta, uno de los protocolos de descongelación utilizado consiste en acercar las muestras de tejido congelado a un cubilete con agua a 90-95 grados sin sumergirlos. Una vez que se empiecen a descongelar, retirar del vial y aplicar diferentes soluciones de rehidratación hasta finalmente colocarlos en una placa de Petri a 37º grados (27). En este trabajo se utilizó el método de descongelación del hospital de Fe que consiste en agitar manualmente los crioviales en un baño María a 42º hasta su completa descongelación. En cualquiera de los métodos es esencial que, una vez descongelado, la retirada del criopreservante sea escalonada, ya que una retirada brusca puede llevar a una expansión y posterior encogimiento de las células que las puede dañar gravemente (23). Otros métodos todavía en estudio para la descongelación de tejido ovárico, ovocitos y embriones incluyen el uso de pulsos de láser infrarrojo, que permitiría simplificar el proceso (21). De cualquier forma, el estrés que supone para los tejidos el cambio de temperaturas, hace inevitable una pérdida de viabilidad.

6.4.2 Localización del trasplante

La localización del trasplante puede ser ortotópica o heterotópica, según se haga en el espacio fisiológico ovárico o en otras partes como puede ser peritoneo, pared abdominal o incluso el antebrazo, técnica que se investiga recientemente para conseguir trasplantes con técnicas mínimamente invasivas (34). La localización del tejido no ha afectado a la aparición o no de instauración hormonal, pudiendo restaurar funciones endocrinas totales entre la semana 10-20 tras el trasplante (16). Sin embargo, todavía queda mucho por investigar sobre la efectividad de la restauración de la fertilidad en los trasplantes heterotópicos pues se ha visto que, en estos trasplantes, las tasas de fertilidad no son tan esperanzadoras como en el caso de los trasplantes ortotópicos (7).

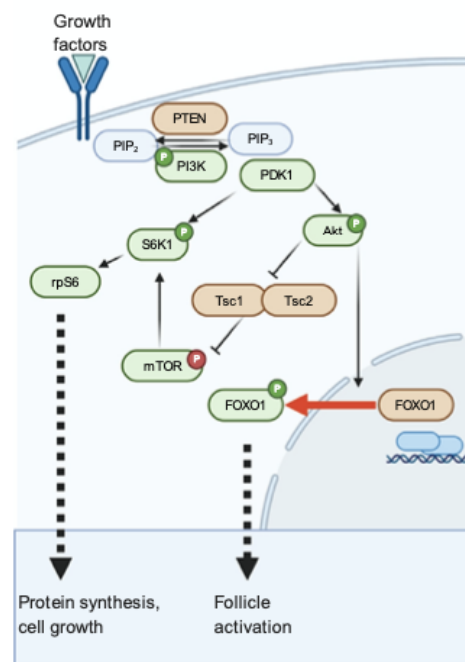
Además, un trasplante ortotópico cuanto más cerca se encuentre de las trompas de Falopio más fácil resulta que pueda traducirse en una concepción natural, mientras que trasplantes más alejados tendrán más probabilidad de tener que recurrir a técnicas de reproducción asistida (20).

6.4.3 Pérdida folicular postrasplante

El principal problema a considerar cuando se trasplantan las muestras es la gran pérdida folicular que se produce. Se estima que dicha pérdida folicular es del 50% en mujeres adultas, aunque en prepúberes se ha observado ser algo menor ya que su principal población son folículos primordiales, más resistentes a la criolesión (35). La pérdida de la reserva ovárica ocurre por dos mecanismos principalmente: por un lado la muerte celular directa por daños en congelación, isquemia u oxidación y por otro la activación masiva de folículos conocido como fenómeno de *burn out* folicular o “consumo folicular”.

Una de las vías del fenómeno burn-out es la vía PI3K (35). La vía PI3K es una ruta fisiológica clave para el metabolismo de nutrientes, supervivencia celular, crecimiento y apoptosis. La activación de uno de sus efectores, Akt se regula entre el efecto inhibidor de la enzima PTEN y el efecto activador de otra enzima llamada PI3K. Cuando predomina el efecto activador, Akt se fosforila, movilizand o otras cascadas de fosforilación como son FOXO1 y mTOR. El FOXO1 es un efector de la vía Akt que actúa como factor de transcripción en el núcleo de los folículos primordiales, suprimiendo su crecimiento. Al fosforilarse, el FOXO1 se transloca, pasando al citoplasma donde pierde su función inhibidora, activando el crecimiento folicular. La participación de mTOR es esencial en la regulación del crecimiento celular y el metabolismo, pero se cree que es una respuesta más tardía, cuando los folículos ya han llegado a cierto punto de maduración, por lo que no estaría implicado en la activación masiva temprana(36) (Figura 7).

Figura 7: Vía PI3K (34)



En condiciones normales las células de la granulosa expresan PTEN, manteniendo la quiescencia de los folículos. Pero ante situaciones de estrés oxidativo se sobre expresa PI3K, desactivando esa inhibición. Son muchos los estudios que han demostrado que esta vía es responsable del consumo masivo folicular tras trasplante como un mero mecanismo de defensa celular (34)(35)(36). Ante la hipoxia, el tejido se defiende activando sus células para sobrevivir.

Se ha estudiado también el papel de otras vías como es Hippo. Esta vía es fundamental para regular el tamaño tisular. Contiene una serie de factores reguladores inhibidores que actúan mediante una cascada de kinasas que fosforilan la vía para que sus efectores YAP/TAZ se mantengan inactivos. Si la vía se daña, aumentan estos niveles de efectores, aumentando el crecimiento celular y la proliferación. Diversos estudios que han valorado la actuación de esta vía en el proceso del burnout muestran diferentes resultados. Masciangelo et al. en un estudio realizado trasplantando tejido ovárico humano en ratones inmunodeprimidos vieron que los niveles de YAP/TAZ aumentaban tras el trasplante, confirmando la participación de esta vía. Pero, sin embargo, estudios posteriores ven que su rol no sería tan importante (34).

De cualquier forma, si se redujera ese periodo de isquemia, tanto el daño celular directo como la posibilidad de activar estas vías sería mucho menor. Como se ha mencionado antes, es por eso que se estudia realizar el trasplante junto con antioxidantes o factores de crecimiento, como VEGF, que optimicen la vascularización del tejido. Una de las sustancias que se ha estudiado es el factor de crecimiento fibroblástico. En un estudio realizado con ratones inmunodeprimidos donde se les trasplantó tejido ovárico junto a láminas de este componente, se observó que la densidad de folículos primordiales era mayor (37). Otra alternativa muy prometedora son las células madre, concretamente las precursoras de tejido adiposo, ya que fomentan considerablemente la angiogénesis. También se vio su efecto en el trasplante a ratones inmunodeprimidos, donde los niveles de hipoxia fueron mucho menores, resultando en una mayor reserva ovárica y una distribución folicular más fisiológica (38).

Recientemente se ha estudiado también en animales la proteína S1P (*Sphingosine-1-phosphate*). Esta vía de inhibición de muerte celular que ya se utiliza contra la muerte apoptótica inducida por radiación y quimioterapia aceleraría la neovasculogénesis, reduciría la hipoxia y mantendría la densidad folicular post-trasplante (10). Se ha visto también que aumenta el número de células estromales, lo que es beneficioso para el injerto (39). Otros estudios han barajado la posibilidad de utilizar células endoteliales diseñadas por ingeniería que expresan constitutivamente Hormona Anti-Mulleriana (AMH), ya que se ha asociado a una reperusión vascular acelerada post-trasplante y un mantenimiento de la reserva de folículos quiescentes. Esto se llevó a cabo gracias a observar que los folículos en crecimiento (como los secundarios) expresan esta hormona para inhibir el crecimiento de los folículos primordiales, manteniendo la reserva. Un ambiente rico en AMH reduce la sensibilidad de los folículos a la hormona estimuladora del folículo (FSH), contribuyendo a una parada del crecimiento folicular (40).

Por último, el uso de cirugía mínimamente invasiva ayudaría también con el problema isquémico, ya que se minimizaría el daño vascular del sitio de trasplante. Además, el uso de robots quirúrgicos aplicaría más precisión que la técnica laparoscópica convencional y el tiempo entre descongelación y trasplante sería menor (41).

6.4.4 Riesgo de trasplante de células malignas

Uno de los problemas que más preocupa a los investigadores es la probabilidad de reintroducir células cancerígenas del tumor primario a la paciente en remisión completa a través del tejido congelado. Es importante especialmente en los cánceres que afectan directamente al tejido gonadal, como pueden ser los tumores hematológicos. Sin embargo, pese a la importancia que conllevaría, no se han observado células cancerígenas en los estudios realizados. Además, previamente a la congelación de las muestras, se pueden analizar con detenimiento en el laboratorio con diferentes marcadores para verificar la ausencia de contaminación de la muestra.

Un ejemplo es el estudio con una niña que sufrió fallo ovárico primario a consecuencia del trasplante de progenitores hematopoyéticos realizado para tratar su leucemia y cuyo tejido se cosechó justo después del primer tratamiento acondicionador. Se congelaron las muestras con la técnica lenta y se realizaron diferentes tinciones de los fragmentos de tejido para comprobar que no estaban contaminados por las células cancerígenas. Diez años después de haberle realizado la preservación, se le trasplantó el tejido y tuvo 2 hijos sanos y ningún indicio de recaída de su leucemia. Este caso demuestra que con los estudios adecuados, la probabilidad de traspasar células cancerígenas a través del tejido congelado puede ser nula (42).

Sin embargo, puede haber casos donde el tejido esté infectado y no se pueda trasplantar a la niña. Para estos casos se están estudiando distintas estrategias de actuación. Desde métodos más sencillos como por ejemplo la aplicación de quimioterapia a dosis bajas previo al trasplante que podría disminuir el riesgo de traspase de células cancerígenas a la muestra, hasta métodos más avanzados y ambiciosos como es el crecimiento de folículos primordiales en el laboratorio hasta estadio de óvulo maduro conocido como crecimiento folicular in vitro. Este método ofrecería otras ventajas como evitar pérdida de folículos por el burnout, isquemia o reclutamiento, con un mayor aprovechamiento de la población folicular primordial y evitando una segunda intervención para el trasplante, entre otras. Sin embargo, el crecimiento folicular in vitro presenta bajas tasas de éxito debido a la complejidad del proceso de la foliculogénesis, complicando el poder mimetizar el proceso en el laboratorio, lo cual hace que se considere todavía experimental.

7. Resultados

7.1 Viabilidad

A continuación, se presentarán los resultados obtenidos en la parte experimental donde se valoró el efecto del tratamiento con diferentes enzimas antes de la congelación del tejido ovárico ovino adulto sobre la calidad del mismo antes y después de congelar. Los valores de viabilidad se expresan en la Tabla 4.

En las muestras antes de congelar (frescas), los mayores porcentajes de viabilidad se observaron con la Dispasa y los menores con la Acutasa. Justo tras la descongelación, la mayor viabilidad se observó con las muestras tratadas con Tryple y de nuevo la Acutasa mostró los valores más bajos de viabilidad. Al cultivar las muestras de tejido tras descongelación durante 2 y 7 días, el tratamiento con Dispasa siguió mostrando los mayores valores de viabilidad. Así, la mejora de viabilidad con respecto al control, antes de congelar se observó en los tratamientos con Tryple, Colagenasa y Dispasa. Sin embargo, justo tras la descongelación que es cuando se suele hacer el trasplante, solamente el tratamiento con Tryple presentaba mejores resultados de viabilidad que el control. Tras 2 días de cultivo, el control presentaba los peores resultados de viabilidad y tras 7 días de cultivo solamente el tratamiento con Dispasa mostraba mejoras en términos de viabilidad con respecto al control. Cabe destacar (Tabla 4) que en todos los tratamientos se observó una disminución de la viabilidad tras la descongelación y el cultivo de las muestras.

	Fresco	0h	2d	7d
Tryple	76,89 ± 0,21 ^a	77,85 ± 0,9 ^a	67,24 ± 0,08 ^{abd}	63,26 ± 0,42 ^{adf}
Colagenasa	81,76 ± 0,5 ^b	66,71 ± 0,25 ^b	66,76 ± 0,2 ^{be}	58,32 ± 0,23 ^b
Dispasa	87,58 ± 0,05 ^c	65,27 ± 0,2 ^c	72,04 ± 0,3 ^c	70,57 ± 0,26 ^c
Acutasa	71,08 ± 0,44 ^d	47,79 ± 0,54 ^d	66,03 ± 0,35 ^{de}	60,06 ± 0,16 ^{dg}
Hialuronidasa	71,49 ± 0,2 ^e	70,25 ± 0,3 ^e	61,81 ± 0,46 ^f	59,69 ± 0,21 ^{ed}
Control	74,01 ± 0,34 ^f	70,32 ± 0,33 ^e	61,52 ± 0,22 ^g	60,06 ± 0,25 ^{fg}
P-value	< 0,001	< 0,001	< 0,001	<0,001

Tabla 4. Valores de viabilidad del tejido (%) antes de congelar y a la descongelación (0h, 2 días y 7 días de cultivo). Valores expresados como media ± error estándar. Diferentes letras en una misma columna muestran diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$)

Este descenso de viabilidad se puede observar comparando los valores totales de viabilidad respecto al tiempo de valoración (sin tener en cuenta tratamientos) (Gráfico 1)

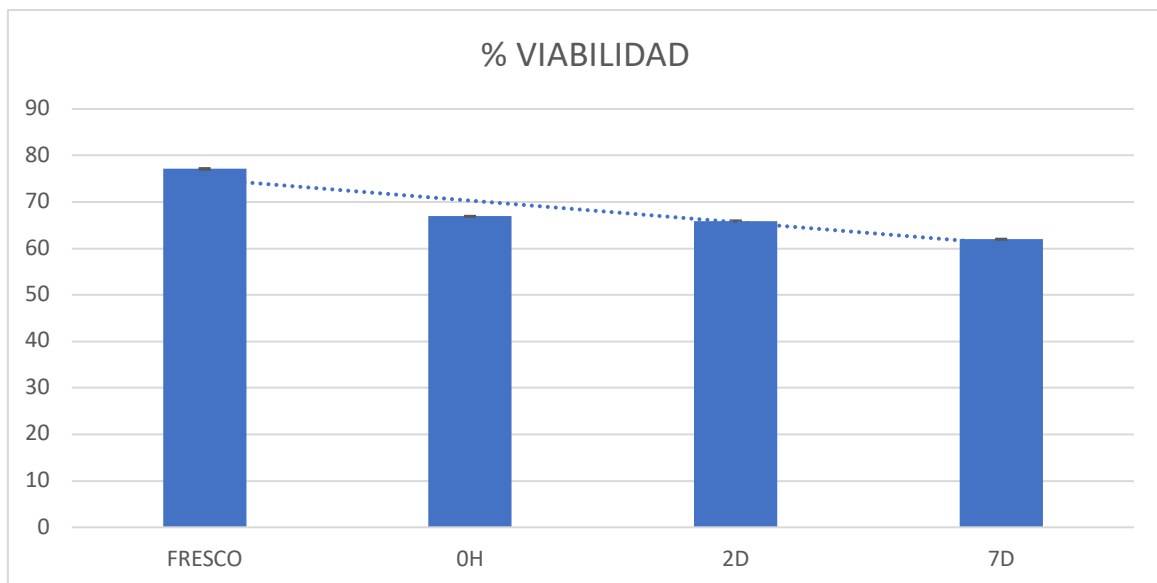


Gráfico 1. Viabilidad del tejido medida en porcentaje de la totalidad de los tratamientos a lo largo del tiempo.

7.2 Morfología del tejido

Se valoró el estado de los folículos y la calidad del estroma. Se contaron número de folículos por placa, por tratamiento y tiempo (sin diferenciar el tipo de folículo).

En las muestras antes de congelar prácticamente la totalidad de folículos se encontraron intactos (219 folículos totales, sólo 1 dañado con Dispasa y otro en control) y el estroma estaba íntegro. Algunos ejemplos de los folículos encontrados y del estado del estroma en dichas muestras se muestran en la Figura 8.

El daño folicular y estromal se empezó a observar tras la descongelación, con una separación de la zona de la granulosa del ovocito, así como pérdida de forma de la membrana basal, plasmática y nuclear en los folículos y aparición de descelularización en la parte estromal. Los tratamientos con Tryple y Hialuronidasa fueron los que mejor preservaron el tejido a las 0h, con alteraciones de folículos entorno al 10% del total de folículos valorados. El tratamiento con Acutasa presentó los peores resultados con múltiples focos de picnosis y necrosis coincidiendo con las viabilidades más bajas medidas a las 0h como se ha mencionado en el apartado anterior. En torno al 50% de los folículos presentaron disgregación de las zonas granulosas, vacuolas y pérdida de forma en los tratamientos con Acutasa. El tratamiento con Colagenasa y Dispasa produjeron daños estromales principalmente en los bordes del tejido, con un estroma más íntegro en la parte central y un porcentaje de folículos afectados en torno al 30%. El control presentaba resultados similares de alteración folicular (30%) y algunos focos de descelularización y necrosis a nivel estromal (Figura 9).

A los 2 días de cultivo tras la descongelación, en todos los tratamientos se observaron más daños tanto a nivel folicular como estromal, con más focos de necrosis y descelularización en general (Figura 10). El tratamiento con Tryple siguió manteniendo mejor la integridad tisular, con pocos focos de necrosis y con un 20% de los folículos alterados. El tratamiento con Hialuronidasa mantenía también la integridad del estroma en la parte interior del tejido, manifestando más descelularización en los bordes, similares porcentajes de viabilidad folicular fueron observados a nivel folicular (30%). En el tratamiento con Colagenasa y en el control el 50% de los folículos estaban dañados y había más desorganización celular a nivel del estroma. El tratamiento con Dispasa mostró mucha desorganización del tejido en los bordes con algún foco de necrosis, manteniendo mejor la integridad en la zona central. Los folículos posicionados en la zona periférica estaban alterados (50%). El tratamiento con Acutasa presentaba los mayores daños a nivel folicular (70%), con alteraciones principalmente en la zona granulosa de los folículos, con múltiples focos de picnosis y más alta descelularización.

A los 7 días de cultivo tras la descongelación, en todos los tratamientos se observó un aumento de los focos de picnosis y necrosis, aumento de celularización y daños a nivel folicular (Figura 11). El tratamiento con Tryple fue el que mejor mantuvo la integridad del tejido (daño folicular 50%) mientras que en el tratamiento con Hialuronidasa los bordes del tejido y los folículos estaban más dañados (60%). En el tratamiento con Dispasa y en el control los daños foliculares ascendieron al 70% con fuertes alteraciones a nivel estromal, estando fundamentalmente en los bordes del tejido en el caso de la Dispasa. Los peores resultados a los 7 días de nuevo se encontraron en el tratamiento con Acutasa y Colagenasa donde la mayor parte del tejido estaba necrosado y los folículos alterados (80%).

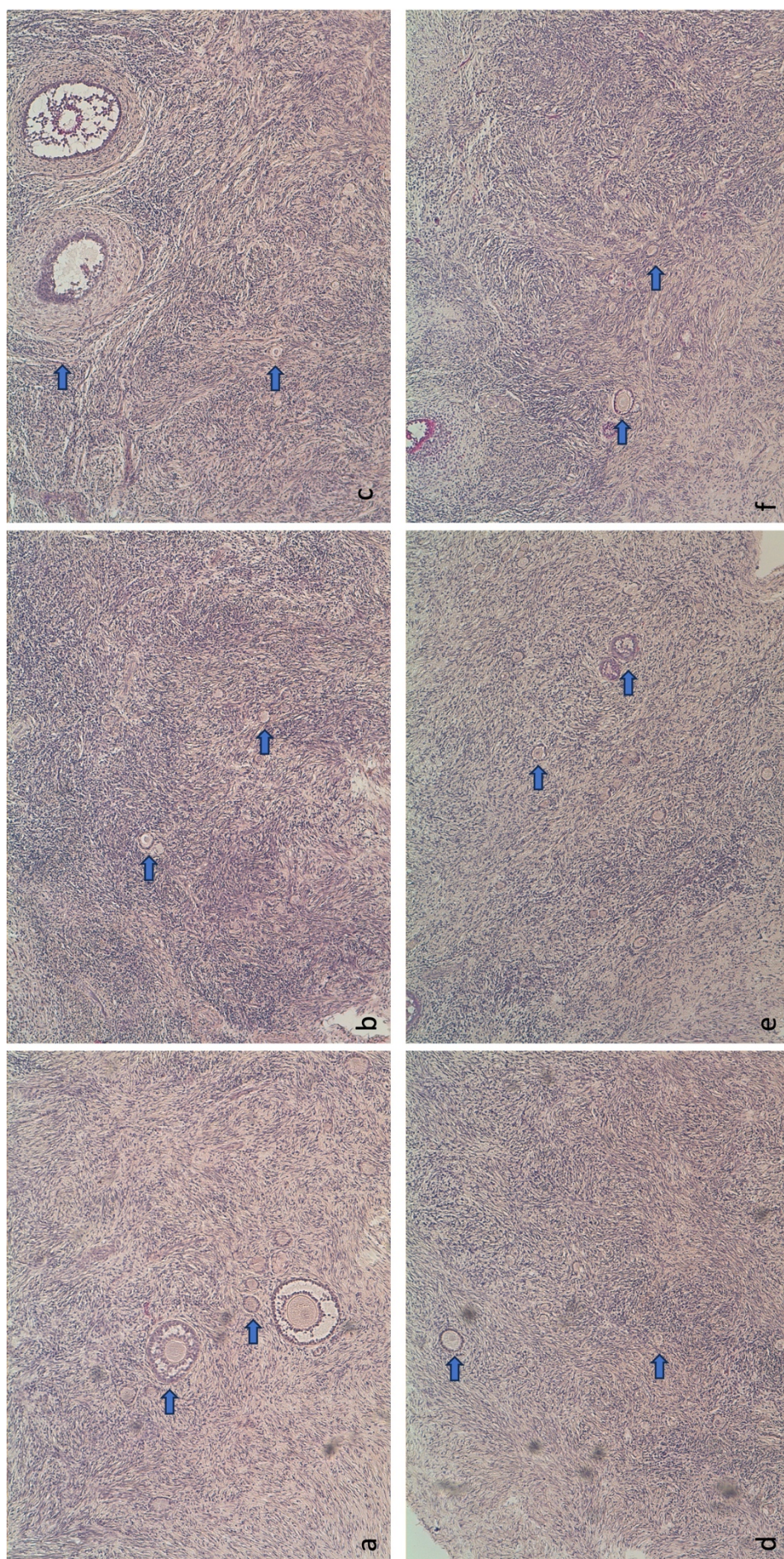


Figura 8. Preparaciones de hematoxilina-eosina de tejido ovárico antes de congelar. a) Tryple, b) Colagenasa, c) Dispasa, d) Acutasa, e) Hialuronidasa, f) Control. Flechas azules señalan folículos sanos.

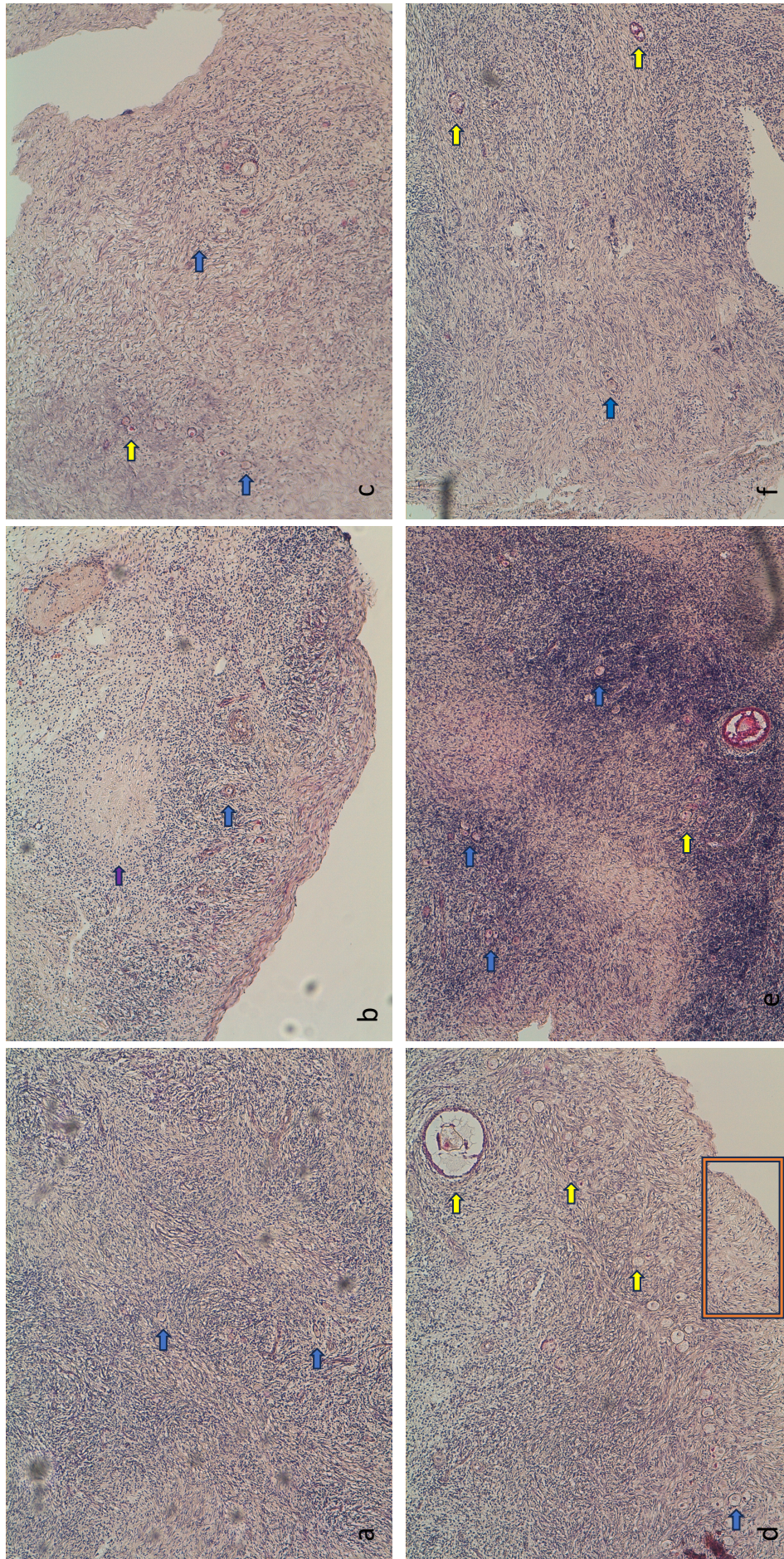


Figura 9. Preparaciones de hematoxilina-eosina de tejido ovárico a las 0h post-descongelación a) Tryple, b) Colagenasa, c) Dispasa, d) Acutasa, e) Hialuronidasa, f) Control. Flechas azules señalan folículos dañados. Flechas amarillas señalan folículos dañados. Flechas rojas señalan zonas de necrosis o picnosis. Flechas moradas señalan zonas de descelularización. Rectángulos naranjas señalan bordes lesionados.

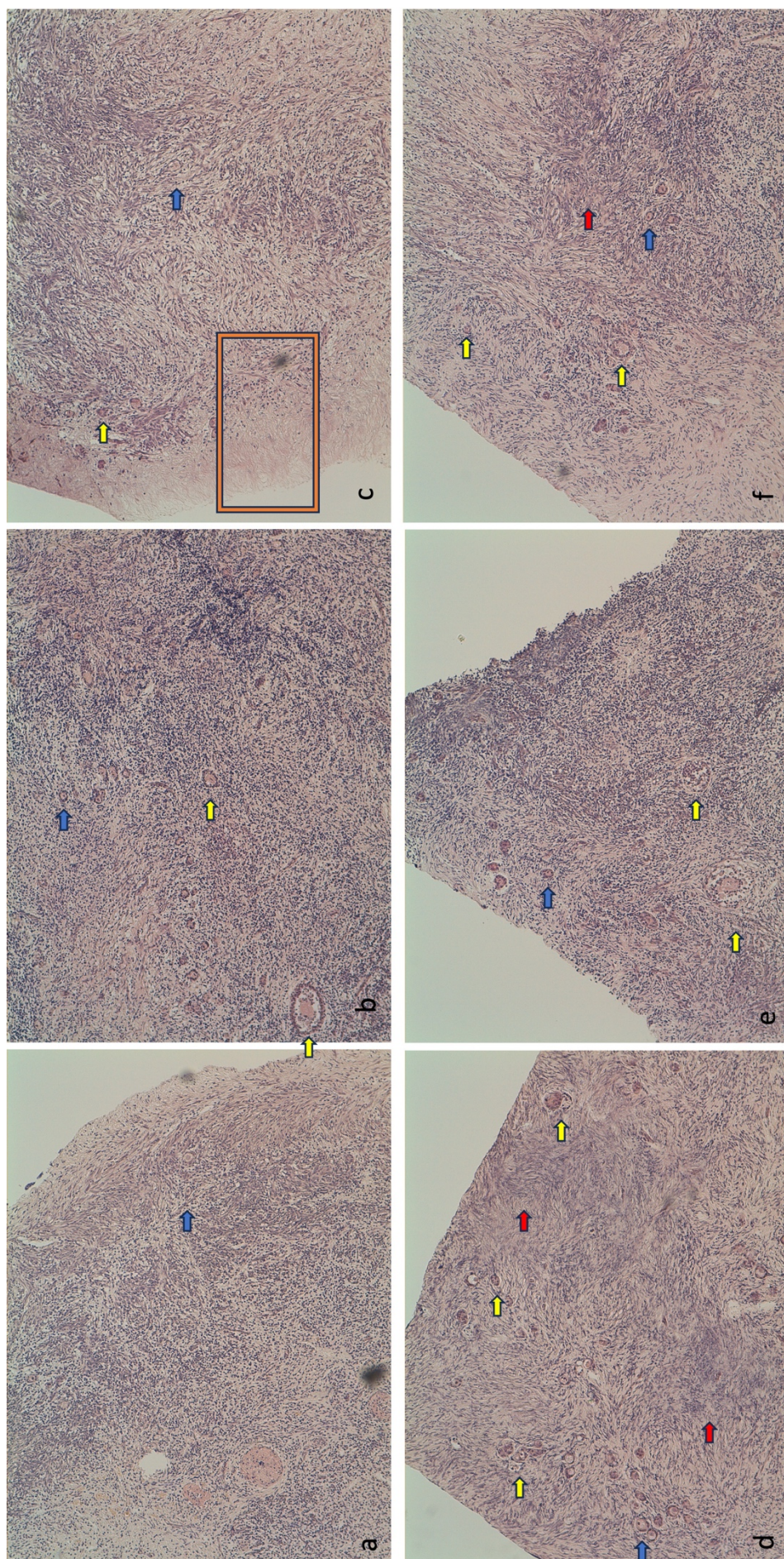


Figura 10. Preparaciones de hematoxilina-eosina de tejido ovárico a los 2 días post-descongelación a) Tryple, b) Colagenasa, c) Dispara, d) Acutasa, e) Hialuronidasa, f) Control. Flechas azules señalan folículos sanos. Flechas amarillas señalan folículos dañados. Flechas rojas señalan zonas de necrosis o picnosis. Rectángulos naranjas señalan bordes lesionados.

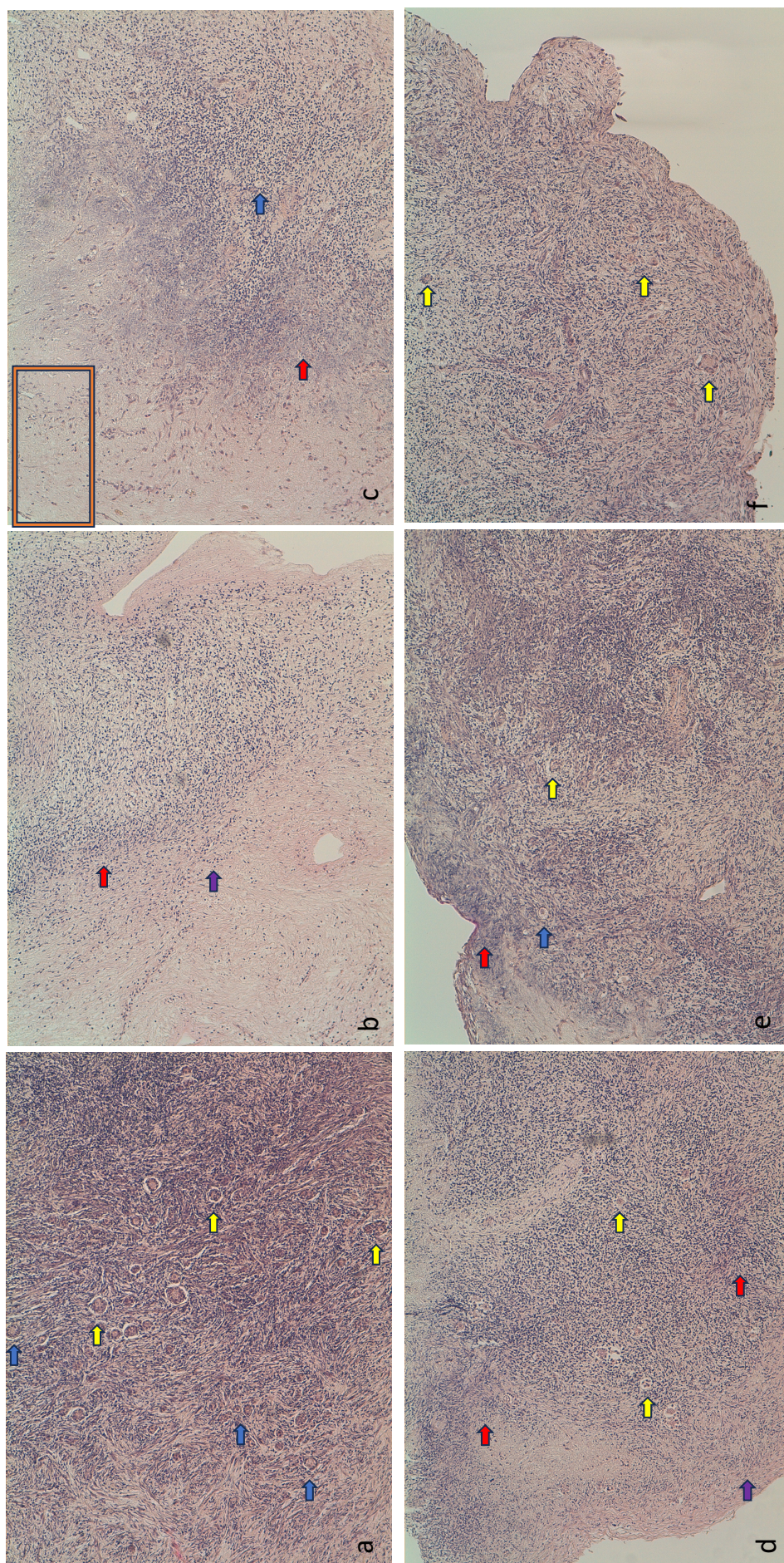


Figura 11 Preparaciones de hematoxilina-eosina de tejido ovárico a los 7 días post-descongelación a) Tryple, b) Colagenasa, c) Dispasa, d) Acutasa, e) Hiduronidasa, f) Control. Flechas azules señalan folículos sanos. Flechas amarillas señalan folículos dañados. Flechas rojas señalan zonas de necrosis o picnosis. Flechas moradas señalan zonas de descelularización. Rectángulos naranjas señalan bordes lesionados.

8. Discusión

Los resultados del presente estudio resultan novedosos en muchos ámbitos. A pesar de que los primeros experimentos en congelación del tejido ovárico datan del siglo XVIII, ha sido más recientemente cuando esta técnica ha recibido más atención con la evolución de los tratamientos contra el cáncer y el aumento de la supervivencia de las pacientes, recurriendo a este método para preservar su fertilidad.

Se han adaptado protocolos de otros tipos de tejido y se han optimizado mediante el estudio de distintos factores considerados importantes para mantener la viabilidad y funcionalidad del tejido a la congelación, como por ejemplo los crioprotectores y las velocidades de congelación. Sin embargo, la baja calidad de los folículos al injerto sigue siendo un problema. Resultados preliminares del grupo de investigación *TME Lab* al que ambos directores de este trabajo pertenecen han demostrado baja penetrabilidad de los crioprotectores mediante el sistema actual de congelación lenta (% de DMSO y tiempos del protocolo), demostrando que tan sólo el 20% del tejido es penetrado por los crioprotectores, dejando el restante 80% sin protección de estos compuestos. La penetración de crioprotectores es importante porque facilita la deshidratación del tejido y por tanto evita la formación de cristales de hielo, dando una posible explicación de esta forma al daño tisular que se produce en estos tejidos tras los procesos de criopreservación. Este hecho no había sido estudiado antes y se publicará próximamente. Por ello se decidió hacer este estudio sobre pre-tratamientos con enzimas utilizadas para disgregar tejidos y ver si se mantenía o incluso mejoraba la calidad del tejido tras la congelación.

Solamente hemos encontrado un artículo en la bibliografía donde usan collagenasa para disgregar parcialmente el tejido ovárico de ratón antes de congelar. Este estudio demostró que durante el proceso de vitrificación hay una separación entre el ovocito y las células de la granulosa por una pérdida de moléculas de adhesinas sin alterar la matriz extracelular. Sin embargo, con el pre-tratamiento con collagenasa se mantenía el ratio entre diámetro del ovocito y diámetro del folículo, manteniendo las adhesiones. Esto se traduciría también en menor atresia de folículos y por tanto una mayor reserva ovárica. Sin embargo, este estudio hace hincapié en la necesidad de adaptar este pre-tratamiento con collagenasa a las distintas especies (24). En el estudio con ratones utilizaron dosis de collagenasa muy bajas (1-100 microgramos/ml) en comparación con nuestro estudio donde usamos 0.83 mg/ml pero los ovarios de ratón y los de humana presentan muchas diferencias en términos de características del estroma y de matriz extracelular así como diferente grosor y fue a esta concentración donde en nuestro estudio piloto vimos que se observaban pequeñas disgregaciones del tejido sin afectar la calidad de los folículos tras el tratamiento. Los resultados obtenidos en ambos estudios son difíciles de comprar ya que en este Trabajo de Fin de Grado se ha utilizado la congelación lenta y en el estudio de ratón la vitrificación, utilizando además diferentes técnicas de valoración y siendo diferentes especies animales. Además, en este estudio se han valorado el efecto de otras cuatro enzimas que se usan de manera habitual para disgregar tejidos (Tryple, Dispasa, Acutasa y Hialuronidasa).

En nuestro estudio el uso de colagenasa no mejoró la viabilidad o morfología estromal y folicular en comparación con el control, a diferencia del estudio con ratones donde sí se vieron mejorías. Sin embargo, tratar el tejido con Tryple resultó en mejoras en porcentajes de viabilidad del tejido justo tras descongelar y el tratamiento con Dispasa mejoró la viabilidad a los 2 y 7 días de cultivo. Conviene mencionar que las mediciones de viabilidad se hicieron de secciones centrales de la pieza del tejido, sin tener en cuenta bordes, para hacer secciones similares, y lo que sí que se observó fueron bordes muy dañados cuando el tejido se sometía al tratamiento con Dispasa. Estos daños no se reflejaban en términos de viabilidad, pero sí en los cortes de hematoxilina eosina con bordes totalmente necrosados. Atendiendo a estos cortes, una mejora en la integridad del estroma y la población folicular fue observada en los tratamientos con Tryple y Hialuronidasa. Este es el primer estudio donde se identifica el efecto beneficioso de estas enzimas para la congelación de tejido ovárico. En estudios próximos nos gustaría valorar si el tratamiento con estas enzimas mejora la penetración de los crioprotectores mediante fluorocromos y poder dar explicación en estas mejoras en viabilidad e integridad.

También nuestros resultados evidencian que la viabilidad disminuye con el tiempo de medición así como la integridad de estroma y de los folículos. Esto sugiere que la estrategia actual de implantar el tejido justo a la descongelación es la adecuada. Sin embargo, otros medios y suplementos de cultivo deberían estudiarse en futuras investigaciones, ya que un reciente estudio realizado en tejido humano mostró mejor reserva de folículos primordiales en el grupo de tejido cultivado con Membrana Corioalantoidea (CAM) que aquellos sin cultivo (43).

El hecho de haber escogido estas enzimas es por porque son enzimas de uso común para el tratamiento de tejidos con fines como el de aislamiento de células. La enzima Hialuronidasa se utiliza en la denudación de los óvulos (desproveerlos del cúmulo ooforo) en los laboratorios de reproducción asistida, para favorecer la penetración del espermatozoide en el proceso de fecundación in vitro. Sin embargo, esta se usa en concentraciones mucho menores a las utilizadas en este estudio, pues en contacto directo con el ovocito es muy lesiva, mientras que penetrar un tejido como se busca en este estudio se requieren mayores concentraciones (0,08 mg/ml para ovocitos vs 2,5 mg/ml para tejido) (44). El complejo enzimático Tryple se usa para aislar células, como células madre mesenquimales para el análisis de sus antígenos de superficie y no ha sido utilizada en tejido ovárico previamente. La enzima Dispasa se ha utilizado de igual modo para aislar diferentes tipos de células, como linfocitos marcados con ciertos anticuerpos o células tumorales. En tejido ovárico, se utiliza para el aislamiento folicular de cara a diseñar ovarios artificiales (45). En cuanto a la enzima Acutasa, aunque en otro tipo de tejidos (fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales vasculares...) ha resultado ser un excelente aislante de células. En el caso del tejido ovárico este es el primer estudio dónde ha sido utilizada y los resultados no son tan prometedores, dando los menores valores de viabilidad y alteraciones en la morfología a nivel de los folículos y del estroma.

Nos gustaría enfatizar que este es el primer estudio donde se ha utilizado la técnica de clarificación para valorar la viabilidad del tejido ovárico, con resultados satisfactorios. Se han publicado algunos artículos donde han medido la viabilidad del tejido ovárico antes

y después de congelar, pero no clarificando previamente (46)(47). En la puesta a punto del protocolo de valoración de viabilidad de tejido ovárico intentamos medir viabilidad siguiendo los protocolos habituales que no incluyen clarificación, encontrando una falta de distribución homogénea de los fluorocromos y muchas secciones sin teñir, complicando la valoración de resultados. El objetivo final de la clarificación es eliminar los pigmentos del tejido para tener una mejor visibilidad con la visualización por microscopio. En nuestro caso, nos ha permitido valorar la viabilidad de forma satisfactoria consiguiendo una distribución homogénea de los fluorocromos calceína y yoduro de propidio, tiñendo la totalidad de la muestra. La clarificación ha sido utilizada en otros tejidos. En un estudio realizado en placenta de primate, se utilizó clarificación y microscopía confocal para valorar la microanatomía del tejido (48). También ha sido utilizada en tejido gástrico de conejo para la evaluación histoquímica de las células secretoras (49).

También este estudio es el primer trabajo donde se ha cuantificado la viabilidad, en nuestro caso usando el software *FIJI*. Esto ha supuesto un gran adelanto ya que nos permite tener datos cuantitativos para comparar con un tamaño de muestra grande y representativo permitiendo identificar los mejores tratamientos en términos de viabilidad. Otros estudios han valorado la viabilidad, como ya hemos mencionado, pero no de forma cuantitativa (46)(47), limitando la interpretación de resultados.

Nuestros resultados podrían haber sido aún más congruentes si hubiéramos podido presentar datos de inmunohistoquímica. Los kits de PCNA y apoptosis han sido utilizados para valorar tejido ovárico en estudios anteriores y podríamos haber comparado resultados. Un estudio empleó ambos kits en tejido ovino para valorar si era mejor la congelación lenta o vitrificación (50). También se han utilizado para comparar la congelación lenta con un congelador programable o un *cell freezer* como el utilizado en este estudio, encontrando resultados similares entre ambos protocolos (25). En otro estudio utilizaron el kit PCNA en tejido ovario humano para valorar la foliculogénesis tras trasplante del tejido descongelado (51). Por su parte, el kit de caspasas ha sido utilizado además en otros tejidos como el tejido espermático para valorar el daño de diferentes crioprotectores tras la criopreservación (52). Quedan pendientes de analizar los resultados de inmunohistoquímica y así completar nuestros resultados.

Conviene mencionar debido al peso que ha tenido en la parte de revisión bibliográfica, que en nuestro trabajo hemos utilizado el método de congelación lenta por ser el estandarizado en Europa y habría que realizar otra serie de estudios para valorar si con la vitrificación, técnica de congelación emergente, existen diferencias al aplicar este pretratamiento enzimático.

Por otro lado, como ya se ha mencionado, los siguientes pasos de esta línea de investigación se centrarán en ver el efecto de estas enzimas en tejido adulto humano para comparar resultados y más tarde valorar su efecto en tejidos prepúberes. De esta manera, podremos saber a ciencia cierta si estos pretratamientos enzimáticos deberían de ser incluidos en el protocolo de congelación de tejido ovárico prepuberal para desarrollar un método más eficaz de preservación de fertilidad de las niñas que padecen cáncer.

9. Conclusiones

Una vez estudiado en profundidad el proceso de criopreservación de tejido ovárico y habiendo analizado los resultados de nuestro estudio, comparando con lo publicado hasta la fecha de hoy, podemos concluir que:

- 1) La congelación de tejido ovárico es la única opción que tienen las mujeres prepúberes para preservar su fertilidad.
- 2) La congelación lenta sigue siendo el método más utilizado para realizar criopreservación de tejido ovárico, aunque la vitrificación puede ser una opción más económica y rápida para realizar el proceso, pero hace falta más investigación al respecto.
- 3) En el protocolo actual de congelación lenta los crioprotectores no penetran la totalidad del tejido, no ejerciendo su efecto protector y pudiendo explicar la disminución en la calidad a la descongelación.
- 4) El tratamiento pre-enzimático antes de la congelación tiene efectos beneficiosos tras descongelar las muestras:
 - 4.1 Tryple y Hialuronidasa pueden ser tratamientos de elección previo a la congelación de tejido ovárico.
 - 4.2 La Acutasa no resulta un tratamiento enzimático aconsejable.
 - 4.3 El tratamiento con Dispasa mantiene la integridad del tejido en el interior, pero los bordes se dañan mucho, lo que podría tener repercusiones tras el injerto.
- 5) Tal y como se hace en la actualidad, nuestros resultados sugieren la realización del injerto inmediatamente tras la descongelación.
- 6) Se requiere de más estudios experimentales para optimizar el proceso de criopreservación de tejido ovárico para mantener la integridad y funcionalidad del tejido ovárico.

10. Bibliografía

1. World Health Organisation [Internet]. 2021 [cited 2022 Dec 12]. Available from: <https://www.who.int/es>
2. Nieto CA, Romaguera PE, López MA, Poveda VS, Cebolla PS, Reines BM, et al. Cáncer infantil en España. Estadísticas 1980-2020 [Internet]. Registro Español de Tumores Infantiles (RETI-SEHOP). 2021. Available from: <http://www.uv.es/rnti>
3. Spears N, Lopes F, Stefansdottir A, Rossi V, De Felici M, Anderson RA, et al. Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Hum Reprod Update*. 2019;25(6):673–93.
4. Sheshpari S, Shahnazi M, Mobarak H, Ahmadian S, Bedate AM, Nariman-Saleh-Fam Z, et al. Ovarian function and reproductive outcome after ovarian tissue transplantation: A systematic review. *J Transl Med* [Internet]. 2019;17(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02149-2>
5. Bedoschi G, Navarro PA, Oktay K. Chemotherapy-induced damage to ovary: Mechanisms and clinical impact. *Futur Oncol*. 2016;12(19):2333–44.
6. Poirot C, Brugieres L, Yakouben K, Prades-Borio M, Marzouk F, de Lambert G, et al. Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation in 418 girls and adolescents up to 15 years of age facing highly gonadotoxic treatment. Twenty years of experience at a single center. Vol. 98, *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*. 2019. p. 630–7.
7. Kim SS, Lee JR. Ovarian Cryopreservation and Transplantation. *Fertil Preserv*. 2021;(May):243–59.
8. Gosden RG. Robert T. Morris, M.D. - Appreciation of an enlightened surgeon and pioneer of ovarian transplantation. *Fertil Steril* [Internet]. 2010;94(6):1960–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.045>
9. Anderson RA, Wallace WHB, Telfer EE. Ovarian tissue cryopreservation for fertility preservation: clinical and research perspectives. *Hum Reprod Open*. 2017;2017(1):1–9.
10. Marin L, Bedoschi G, Kawahara T, Oktay KH. History, Evolution and Current State of Ovarian Tissue Auto-Transplantation with Cryopreserved Tissue: a Successful Translational Research Journey from 1999 to 2020. [cited 2023 Jan 15]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00066-9>
11. Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Obstet Gynecol*. 2005;105(1):214.
12. Ernst E, Kjærsgaard M, Birkebæk NH, Clausen N, Andersen CY. Case report: Stimulation of puberty in a girl with chemo- and radiation therapy induced

ovarian failure by transplantation of a small part of her frozen/thawed ovarian tissue. *Eur J Cancer*. 2013;49(4):911–4.

13. Dreamstime [Internet]. [cited 2023 Feb 17]. Available from: <https://es.dreamstime.com/corteza-ovárica-folículos-que-muestra-bajo-el-epitelio-germinal-ovárico-varias-capas-de-primordiales-y-primarios-estroma-con-image231620280%0Ahttps://thumbs.dreamstime.com/z/corteza-ovárica-folículos-que-muestra-bajo-el-epitelio->
14. Christianson MS, Lukish DA, McCarter R, Pryor H, Lukish JR. Ovarian tissue cryopreservation in young females with cancer and its impact on ovarian follicle density. *J Pediatr Surg* [Internet]. 2021;56(12):2354–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2021.05.005>
15. Clark RA, Mostoufi-Moab S, Yasui Y, Vu NK, Sklar CA, Motan T, et al. Predicting acute ovarian failure in female survivors of childhood cancer: a cohort study in the Childhood Cancer Survivor Study (CCSS) and the St Jude Lifetime Cohort (SJLIFE). *Lancet Oncol* [Internet]. 2020;21(3):436–45. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30818-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30818-6)
16. Kim SS. Assessment of long term endocrine function after transplantation of frozen-thawed human ovarian tissue to the heterotopic site: 10 year longitudinal follow-up study.
17. Lukish JR. Laparoscopic assisted extracorporeal ovarian harvest: A novel technique to optimize ovarian tissue for cryopreservation in young females with cancer. *J Pediatr Surg* [Internet]. 2021;56(3):626–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2020.11.004>
18. Del-Pozo-Lerida S, Salvador C, Martinez-Soler F, Tortosa A, Perucho M, Gimenez-Bonafe P. Preservation of fertility in patients with cancer (Review) [Internet]. *Oncology Reports*. 2019 Mar. Available from: <http://cancerinfantil>.
19. Lantsberg D, Farhi A, Zaslavsky-Paltiel I, Silverman BG, Lerner-Geva L, Orvieto R. Deliveries following fertility preservation by ovarian tissue cryopreservation without autotransplantation—what should be expected? *J Assist Reprod Genet*. 2019;36(2):335–40.
20. Sanidad MDE, Social CYB. Informes, estudios e investigación 2018 ministerio de sanidad, consumo y bienestar social. 2018.
21. Lee S, Ozkavukcu S, Ku SY. Current and Future Perspectives for Improving Ovarian Tissue Cryopreservation and Transplantation Outcomes for Cancer Patients. Vol. 28, *Reproductive Sciences*. 2021. p. 1746–58.
22. Whaley D, Damyar K, Witek RP, Mendoza A, Alexander M, Lakey JRT. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant*. 2021;30:1–12.

23. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Basic principles of cryopreservation. *Cryoconservation Anim Genet Resour*. 2012;85–94.
24. Kawai T, Shimada M. Pretreatment of ovaries with collagenase before vitrification keeps the ovarian reserve by maintaining cell-cell adhesion integrity in ovarian follicles. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-63948-y>
25. Lierman S, Bus A, Andries S, Trias E, Bols PEJ, Tilleman K. Passive slow freezing is an efficacious and cost-effective alternative to controlled slow freezing for ovarian tissue cryopreservation. *Cryobiology* [Internet]. 2021;100(December 2020):164–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.01.013>
26. Gosden RG. General principles of cryopreservation. *Methods Mol Biol*. 2014;1154:261–8.
27. Gook DA. Human ovarian tissue slow freezing. *Methods Mol Biol*. 2017;1568:161–76.
28. Herraiz S, Novella-Maestre E, Rodríguez B, Díaz C, Sánchez-Serrano M, Mirabet V, et al. Improving ovarian tissue cryopreservation for oncologic patients: Slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. *Fertil Steril*. 2014;101(3).
29. Kong HS, Kim EJ, Youm HW, Kim SK, Lee JR, Suh CS, et al. Improvement in ovarian tissue quality with supplementation of antifreeze protein during warming of vitrified mouse ovarian tissue. *Yonsei Med J*. 2018;59(2):331–6.
30. KITAZATO CORPORATION. Ova Cryo Kit- Ovarian Tissue Vitrification Kit. 2021. 2021.
31. Shi Q, Xie Y, Wang Y, Li S. Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: A systematic review and meta-anlaysis. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09005-7>
32. Kometas M, Christman GM, Kramer J, Rhoton-Vlasak A. Methods of Ovarian Tissue Cryopreservation: Is Vitrification Superior to Slow Freezing?—Ovarian Tissue Freezing Methods. Vol. 28, *Reproductive Sciences*. 2021. p. 3291–302.
33. Fabbri R, Vicenti R, Magnani V, Paradisi R, Lima M, De Meis L, et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: 20 years experience in Bologna University. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13(October):1–9.
34. Dolmans MM, Donnez J, Cacciottola L. Fertility Preservation: The Challenge of Freezing and Transplanting Ovarian Tissue. *Trends Mol Med* [Internet]. 2021;27(8):777–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.11.003>

35. Dolmans MM, von Wolff M, Poirot C, Diaz-Garcia C, Cacciottola L, Boissel N, et al. Transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a series of 285 women: a review of five leading European centers. *Fertil Steril* [Internet]. 2021;115(5):1102–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2021.03.008>
36. Masciangelo R, Hossay C, Chiti MC, Manavella DD, Amorim CA, Donnez J, et al. Role of the PI3K and Hippo pathways in follicle activation after grafting of human ovarian tissue. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(1):101–8.
37. Tanaka A, Nakamura H, Tabata Y, Fujimori Y, Kumasawa K, Kimura T. Effect of sustained release of basic fibroblast growth factor using biodegradable gelatin hydrogels on frozen-thawed human ovarian tissue in a xenograft model. *J Obstet Gynaecol Res.* 2018;44(10):1947–55.
38. Cacciottola L, Nguyen TYT, Chiti MC, Camboni A, Amorim CA, Donnez J, et al. Long-term advantages of ovarian reserve maintenance and follicle development using adipose tissue-derived stem cells in ovarian tissue transplantation. *J Clin Med.* 2020;9(9):1–18.
39. Soleimani R, Heytens E, Oktay K. Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS One.* 2011;6(4).
40. Grosbois J, Devos M, Demeestere I. Implications of Nonphysiological Ovarian Primordial Follicle Activation for Fertility Preservation. [cited 2023 Feb 19]; Available from: <https://academic.oup.com/edrv847>
41. Oktay K, Bedoschi G, Pacheco F, Turan V, Emirdar V. First pregnancies, live birth, and in vitro fertilization outcomes after transplantation of frozen-banked ovarian tissue with a human extracellular matrix scaffold using robot-assisted minimally invasive surgery. *Am J Obstet Gynecol* [Internet]. 2016;214(1):94.e1-94.e9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.10.001>
42. Shapira M, Raanani H, Barshack I, Amariglio N, Derech-Haim S, Marciano MN, et al. First delivery in a leukemia survivor after transplantation of cryopreserved ovarian tissue, evaluated for leukemia cells contamination. *Fertil Steril* [Internet]. 2018;109(1):48–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.09.001>
43. Hossay C, Tramacere F, Cacciottola L, Camboni A, Squifflet J-L, Donnez J, et al. Follicle outcomes in human ovarian tissue: effect of freezing, culture, and grafting. *Fertil Steril* [Internet]. 2023 Jan;119(1):135–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028222017812>
44. de Moura BRL, Gurgel MCA, Machado SPP, Marques PA, Rolim JR, de Lima MC, et al. Low concentration of hyaluronidase for oocyte denudation can improve fertilization rates and embryo quality. *J Bras Reprod Assist.* 2017;21(1):27–30.

45. Chen J, Isachenko E, Wang W, Du X, Wang M, Rahimi G, et al. Optimization of Follicle Isolation for Bioengineering of Human Artificial Ovary. *Biopreserv Biobank* [Internet]. 2022 Dec 1;20(6):529–39. Available from: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/bio.2021.0060>
46. Li Y, Ruan X, Liebenthron J, Montag M, Zhou Q, Kong W, et al. Ovarian tissue cryopreservation for patients with premature ovary insufficiency caused by cancer treatment: optimal protocol. *Climacteric*. 2019;22(4):383–9.
47. Jin F, Ruan X, Juan D, Li Y, Cheng J, Wang H, et al. Ovarian tissue cryopreservation: prospective randomized study on thawed ovarian tissue viability to estimate the maximum possible delivery time of tissue samples. *Gynecol Endocrinol* [Internet]. 2019;35(7):591–4. Available from: <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1572736>
48. Sargent JA, Roberts VHJ, Gaffney JE, Frias AE. Clarification and confocal imaging of the nonhuman primate placental micro-anatomy. *Biotechniques*. 2019;66(2):79–84.
49. Cipou M, Damian A, Rus V, Martonos C, Ratiu IA, Miclaus V, et al. Histochemical Assessment of Mucin-Secreting Cells in the Stomach of Domestic Rabbit. *Int J Morphol* [Internet]. 2022;40(4):915–9. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022022000400915&lng=en&nrm=iso&tlng=en
50. Cui YT, Yang LK, Liu J, Han YL, Chen C, Deng XH, et al. [Effects of Vitrification with Self-made Carriers and Slow Programmed Freezing on Ovarian Tissue of Sheep]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* [Internet]. 2021 Apr 28;43(2):193–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33966697>
51. Vatanparast M, Karimi Zarchi M, Nabi A, Ali Khalili M. Proliferating cell nuclear antigen presentation, as a marker of folliculogenesis, in the transplanted ovarian tissue. *J Obstet Gynaecol Res* [Internet]. 2021 Dec 22;47(12):4340–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jog.15022>
52. Macente BI, Apparicio M, Mansano CFM, Tavares MR, Fonseca-Alves CE, Sousa BP, et al. Effect of cryopreservation on sperm DNA fragmentation and apoptosis rates in the testicular tissue of domestic cats. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2019;211:106224. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106224>